

ZENTRUM FÜR INNERE MEDIZIN  
KLINIK III HÄMATOLOGIE, ONKOLOGIE, PALLIATIVMEDIZIN  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. CHRISTIAN JUNGHANß

# **Untersuchungen zu Expression und Funktion der miR-155 in Zellen der akuten Leukämie**

---

**Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock**

vorgelegt von  
Moritz Gerhard Hans-Christoph Goetz  
aus Garmisch-Partenkirchen  
Rostock, 2016  
Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger

## **Gutachter dieser Arbeit:**

- Prof. Dr. med. Christian Junghanß, Universitätsklinikum Rostock
- Prof. Dr. med. Carl Friedrich Classen, Universitätsklinikum Rostock
- Prof. Dr. med. Christoph Kahl, Klinikum Magdeburg

Die Dissertation wurde **eingereicht am 29.03.2016** und **verteidigt am 28.03.2017**.

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1.	microRNAs .....	1
1.1.1	Biogenese .....	2
1.1.2.	Wirkungsmechanismus .....	5
1.2.	Die microRNA-155 .....	7
1.3.	Akute Leukämien .....	9
1.3.1.	Akute lymphatische Leukämien .....	10
1.3.2.	Akute myeloische Leukämien .....	12
1.4.	Zielstellung .....	14
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1.	Materialien .....	16
2.1.1	Chemikalien .....	16
2.1.2.	Kits, Fertiglösungen und Enzyme .....	17
2.1.3.	Nährmedien und Antibiotika .....	18
2.1.4.	Geräte und Materialien .....	18
2.1.5.	Puffer und Lösungen .....	19
2.1.6.	Primer und Oligonukleotide .....	20
2.1.7.	Antikörper .....	21
2.1.8.	Zelllinien .....	22
2.2.	Zellbiologische Methoden .....	23
2.2.1.	Zellkultur .....	23
2.2.2.	Isolierung von mononukleären Zellen aus Blut und Knochenmark .....	24
2.2.3.	Gewinnung von B-Lymphozyten aus PBMCs .....	25
2.2.4.	Isolierung hämatopoetischer Stammzellen aus Knochenmarkpunktat .....	26
2.2.5.	Transfektion von Suspensionszellen .....	27
2.2.6.	Behandlung von Zellkulturen mit Sorafenib .....	28
2.2.7.	Durchflusszytometrie .....	29
2.2.7.1.	Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate .....	29
2.2.7.2.	Bestimmung der Transfektionseffizienz .....	30
2.2.7.3.	Untersuchung der <i>de novo</i> -Leukämiezellen .....	30
2.2.8.	Bestimmung der Stoffwechselaktivität mittels WST-1-Test .....	31
2.3.	Molekularbiologische Methoden .....	31
2.3.1.	Isolierung der RNA .....	31
2.3.2.	Messung der RNA-Konzentration .....	32

2.3.3.	Reverse Transkription.....	32
2.3.3.1.	Reverse Transkription kleiner RNAs.....	32
2.3.3.2.	Reverse Transkription der gesamten mRNA.....	33
2.3.4.	Quantitative Real-Time PCR.....	34
2.3.4.1.	Quantitative PCR der miR-155.....	34
2.3.4.2.	Quantitative PCR von BIC und Glucuronidase.....	35
2.4.	Proteinbiochemische Verfahren.....	36
2.4.1.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	36
2.4.2.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	37
2.4.3.	Semi Dry Western Blot.....	37
2.5.	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	39
2.6.	Statistische Auswertung.....	39
2.6.1.	Statistische Auswertung.....	39
2.6.2.	Auswertung der quantitativen PCR.....	40
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
3.1.	Quantitative PCR für die miR-155 und BIC.....	41
3.2.	Anreicherung der hämatopoetischen Stammzellen.....	42
3.3.	Expression der miR-155 und seines Vorläufers BIC.....	43
3.4.	Expression der miR-155 in <i>de novo</i> -Leukämiezellen.....	46
3.4.1.	Prognostische Bedeutung der miR-155.....	49
3.4.2.	Zusammenhang der miR-155-Expression mit prognostischen Faktoren.....	50
3.4.3.	Zusammenhang der miR-155-Expression mit dem FAB-Subtyp.....	52
3.5.	Hemmung der miR-155 in Zellen der akuten Leukämie.....	54
3.5.1.	Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	54
3.5.2.	Einfluss der Inhibition auf die Expression der miR-155.....	55
3.5.3.	Zellproliferation nach Inhibition der miR-155.....	57
3.5.4.	Metabolische Aktivität nach Transfektion eines miR-155-Inhibitors.....	58
3.5.5.	Einfluss der miR-155-Hemmung auf Apoptose und Nekrose.....	59
3.6.	Überexpression der miR-155 in Zellen der akuten Leukämie.....	60
3.6.1.	Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	61
3.6.2.	Einfluss der Überexpression auf die miR-155-Expression.....	62
3.6.3.	Einfluss der Überexpression der miR-155 auf die Zellproliferation.....	63
3.6.4.	Einfluss der Überexpression der miR-155 auf die metabolische Aktivität ....	64
3.6.5.	Apoptose- und Nekroseraten nach Transfektion eines miR-155 Mimic.....	65

3.6.6.	miR-155 beeinflusst die Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges .....	67
3.7.	Behandlung von Zellen der akuten Leukämie mit dem Kinaseinhibitor Sorafenib.....	68
3.7.1.	Sorafenib hemmt die Zellproliferation .....	68
3.7.2.	Einfluss von Sorafenib auf die metabolische Aktivität .....	70
3.7.3.	Apoptose- und Nekroseraten unter der Behandlung mit Sorafenib.....	71
3.7.4.	Einfluss von Sorafenib auf die Expression der miR-155 .....	72
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>74</b>
4.1.	miR-155/BIC in akuten Leukämien und gesunden Zellen .....	74
4.2.	Expression der miR-155 in de novo-Zellen.....	78
4.2.1.	Prognostische Bedeutung der miR-155 .....	79
4.2.2.	Zusammenhang der miR-155 mit molekularen prognostischen Faktoren.....	80
4.2.3.	Expression der miR-155 in FAB-Subtypen.....	82
4.3.	Methodische Aspekte der Transfektionsversuche .....	82
4.4.	Funktionelle Bedeutung der miR-155 .....	83
4.5.	Einfluss der miR-155 auf den PI3K/Akt-Signalweg .....	86
4.6.	Sorafenib als effektives Medikament in akuten Leukämien.....	87
<b>5.</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick .....</b>	<b>90</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>91</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>I</b>
	<b><u>Abkürzungsverzeichnis.....</u></b>	<b>XVII</b>
	<b><u>Danksagung.....</u></b>	<b>XXIII</b>

Akute Leukämien sind bis zum heutigen Tage Erkrankungen, die häufig zum Tode führen. Die Erforschung der Entstehung dieser Krankheiten sowie die Entdeckung neuer Therapiemöglichkeiten stehen daher weiterhin im Fokus. Vor kurzer Zeit entdeckte regulative Moleküle, die microRNAs, spielen in vielen malignen Erkrankungen eine herausragende Rolle. Welche Rolle der miR-155 in akuten Leukämien zukommt, soll in dieser Arbeit anhand von Untersuchungen an Zelllinien und klinischen Daten dargestellt werden.

## 1. Einleitung

### 1.1. microRNAs

Eine Zelle ist äußeren Einflüssen ausgesetzt, welche sich ständig ändern. Um sich den Gegebenheiten anzupassen, sind evolutionär verschiedene Regulationsmechanismen entstanden, die den Stoffwechsel auf die äußeren Gegebenheiten einstellen. Einer dieser Mechanismen wurde in der Mitte der 1990er-Jahre entdeckt und wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet.[1] Der Mechanismus beruht auf komplementärer Basenpaarung zwischen RNA-Strängen und wird durch einen Multiproteinkomplex vermittelt. Die Ausbildung doppelsträngiger RNA führt zu einer Inhibition der Proteinsynthese und damit zu einer Kontrolle der Expression proteinkodierender Gene. Eine Klasse von einzelsträngigen RNAs, die die sequenzspezifische Regulation zielgerichtet ermöglichen, wird microRNAs genannt. Der Mechanismus der RNA-Interferenz ist evolutionär hoch konserviert und findet sich sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Zellen.[2]

microRNAs (miRNAs, miRs) sind kleine einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von ungefähr 21 Nukleotiden.[3] Ihre spezifische Sequenz bildet die Erkennungseinheit für den Multiproteinkomplex RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). Dieser Komplex bindet an die Ziel-RNA und greift regulativ in den Translationsmechanismus oder die Stabilität der mRNA ein. miRNAs regulieren eine Vielzahl von zellulären Prozessen. Zu diesen gehören Stoffwechselprozesse, eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen, aber auch die Regulation des Zellzyklus, der Differenzierung und der Steuerung von Apoptose und Nekrose. Welche Schlüsselrolle den miRNAs in der Regulation der Zellhomöostase zukommt, erkennt man an der Tatsache, dass mehr als 60 Prozent aller proteinkodierenden Gene durch miRNAs reguliert werden.[4] microRNAs sind eine Klasse von nichtproteinkodierenden Genen, die selbst in verschiedenen Spezies ähnliche Sequenzen aufweisen. Beispielsweise zeigen ca. 55 Pro-

zent der menschlichen miRNA-Sequenzen Homologien in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*. [5]

Im menschlichen Genom werden von der Datenbank miRNA database ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) aktuell (Stand: November 2015) 2.588 miRNA-Sequenzen gelistet. Die Gene dieser miRNAs liegen häufig (> 40 Prozent) in Clustern und sind im gesamten Genom verteilt. [6] Diese Cluster werden als transkriptionelle Einheit abgelesen und als polycistronischer Vorläufer weiter prozessiert. [7] miRNA-Gene können jedoch auch einzeln in nicht-proteinkodierenden Abschnitten oder in Exons bzw. Introns von proteinkodierenden Genen liegen. Die meisten miRNAs haben mehrere Isoformen, die sich nur in den Nukleotidpositionen 2-7 gleichen. Dieser Bereich wird als *Seed*-Region bezeichnet und ist für die komplementäre Basenpaarung zwischen microRNA und Ziel-RNA essenziell. Da sie in den anderen Positionen voneinander abweichen, wird vermutet, dass sich ihre Funktionen durch Variabilität an diesen Stellen unterscheiden. [8]

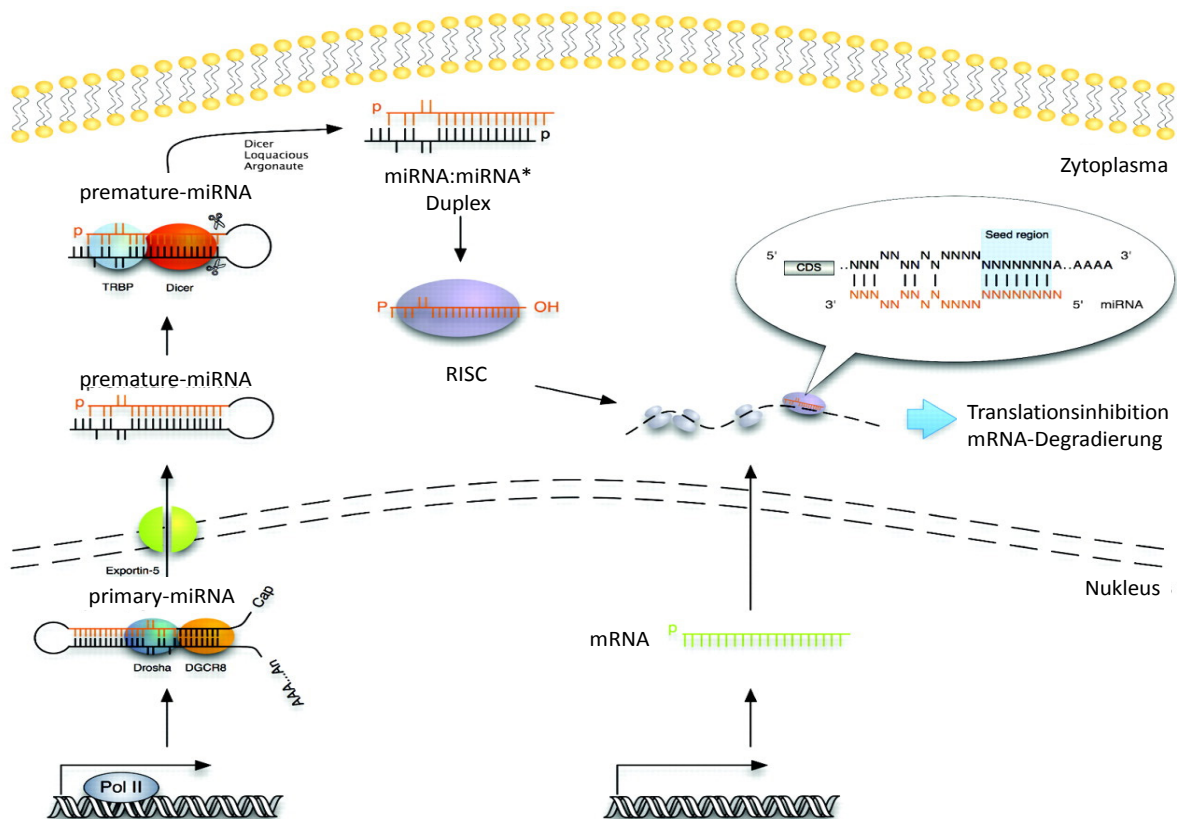
In malignen Erkrankungen spielt die Dysregulation von miRNAs eine große Rolle. Maligne entartete Zellen zeigen häufig zytogenetische Auffälligkeiten wie Translokationen, Deletionen, Inversionen oder Amplifikationen. Diese beruhen auf Strangbrüchen der DNA. Die fragilen Regionen, in denen es häufig zu Strangbrüchen kommt, kodieren häufig für miRNAs. [9] Veränderungen an diesen Stellen führen potenziell zu Dysregulation bzw. Depression der miRNA-Expression. Auch andere Mechanismen, wie epigenetische Veränderungen, Mutationen oder Defekte der miRNA-Biogenese können zu einer veränderten Expression der miRNAs führen. Deregulierte miRNAs können durch die Beeinflussung nachgeschalteter Signalwege als Onkogene oder Tumorsuppressorgene einen Einfluss auf den Stoffwechsel und die Genese maligner Erkrankungen haben. [10–12] Die Biogenese und der Wirkungsmechanismus der microRNAs sind im Folgenden detailliert dargestellt.

### 1.1.1 Biogenese

Die Biogenese der miRNAs erfolgt in mehreren enzymatischen Schritten und ist auf verschiedene Zellkompartimente verteilt. Das Primärtranskript des miRNA-Gens wird typischerweise von der Polymerase II (Pol II) synthetisiert. [13] Die Transkripte weisen eine Länge von mehreren Kilobasen auf und werden posttranskriptionell polyadenyliert und mit einer 5'-Kappe versehen. Intramolekulare Basenpaarungen führen zu der typischen Struktur der

sogenannten *primary-microRNA* (pri-miRNA), die eine Haarnadelstruktur und zwei einzelsträngige Arme aufweist.[14]

Bereits im Zellkern werden die pri-miRNAs gespalten. Große Teile der einzelsträngigen Sequenzen werden durch diesen Schritt abgetrennt. Dies geschieht durch die Endonuklease RNase III Drosha.[15] Drosha bildet zusammen mit anderen Kofaktoren einen Multiproteinkomplex, der als Mikroprozessor bezeichnet wird. Ein wesentliches Element dieses Komplexes ist das Protein DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*). Die kurzen Haarnadelstrukturen, die von Drosha entlassen werden, zeigen eine Größe von 60 bis 70 Nukleotiden. Die sogenannten *premature-microRNAs* (pre-miRNAs) besitzen nach der Spaltung ein Phosphat am 5'-Ende und einen zwei Nukleotide langen Überhang am 3'-Ende.[16]



**Abbildung 1: Biogenese der miRNAs**

Schematisch dargestellt ist die Biogenese und die Prozessierung der miRNAs aus Luo et al.[17] Pol II: Polymerase II, A: Adenin, N: Nukleotid, P: Phosphat



Der Transport der pre-miRNAs in das Zytosol erfolgt über das Kanalprotein Exportin-5 (Exp5). Dazu bedarf es der GTPase Ran, die mit Exportin und den pre-miRNAs einen Komplex bildet. Durch Hydrolyse von GTP werden die pre-microRNAs in das Zytosol entlassen. Der Transport aus dem Kern in das Zytosol findet dabei unabhängig von der Sequenz der miRNAs statt.[18]

Im Zytosol erfolgt eine weitere Spaltung der Transkripte, wodurch die miRNAs ihre endgültige Struktur erhalten. Die Spaltung der pre-miRNAs übernimmt eine weitere RNase III namens Dicer.[19, 20] Diese Endonuklease schneidet zwei helikale Drehungen entfernt vom Ende der Haarnadelstruktur beide komplementäre Stränge und trennt somit die Schleife vom Doppelstrang. Die Doppelstränge bestehen nun aus zwei über Wasserstoffbrückenbindungen verbundenen Strängen, von denen der eine als miRNA und der andere als miRNA\* bezeichnet wird. (Da neuerdings mehrere Beispiele entdeckt wurden, bei denen beide Stränge zu einer reifen miRNA prozessiert werden können, werden diese auch mit dem Suffix -3p oder -5p unterschieden, je nachdem, von welchem Strang diese entstammen.) Auch diese zweite Spaltung erfolgt in einem Multiproteinkomplex, der auch an der Selektion des Stranges und der Einbettung der miRNA in den RISC-Komplex beteiligt ist. Die Proteine TRBP (*TAR RNA-binding protein*) und PACT (*Protein activator of PKR*) sind integrale Bestandteile dieses Komplexes.[21, 22]

Von dem RNA-Duplex, bestehend aus miRNA und miRNA\*, wird häufig nur ein Strang in den RISC aufgenommen, während der andere degradiert wird. Welcher der beiden Stränge aufgenommen wird, hängt hauptsächlich von der thermodynamischen Stabilität des Doppelstranges ab. Der Strang, der an seinem 5'-Ende eine labilere Basenpaarung aufweist, wird gewöhnlich in den Komplex aufgenommen.[23, 24] Am Beladen des RISC sind verschiedene Proteine beteiligt, die zusammen den sogenannten *RISC Loading Complex* (RLC) bilden. Dieser Komplex wird unter anderem aus Dicer, TRBP und Argonautproteinen (AGO) gebildet. Nach der Prozessierung der pre-microRNA durch Dicer wird der RNA-Duplex vermutlich durch TRBP gebunden und an das Argonautprotein weitergegeben.[25, 26] Es existieren jedoch Hinweise darauf, dass noch andere Faktoren an der Selektion des Stranges beteiligt sind. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unbekannt.[27]

Die Biogenese der microRNAs wird durch verschiedene Mechanismen kontrolliert. Zum einen kann die Expression der Gene, welche für miRNAs kodieren, reguliert werden. Außerdem erfolgt eine Regulierung auf verschiedenen Stufen der Prozessierung. Die Prozessierung der Vorstufen durch die Enzyme Drosha und Dicer wird sowohl durch Expressionskontrolle

der Enzyme als auch durch deren Kofaktoren reguliert. Die Desaminierung von Adenosin zu Inosin durch Adenosin-Desaminasen (ADAR) oder andere posttranskriptionelle Modifikationen sind weitere Mechanismen, die an der Kontrolle der miRNA-Expression beteiligt sind (Übersichtsartikel von Krol et al.[28]).

### *1.1.2. Wirkungsmechanismus*

Der Mechanismus, durch welchen miRNAs auf die Proteinsynthese Einfluss nehmen, ist ein Vorgang, der intensiv erforscht wird. Über den Wirkmechanismus der miRNAs wurden bereits viele teils widersprüchliche Studien veröffentlicht. Der Komplex RISC mit seinen Untereinheiten ist maßgeblich an der Vermittlung der Regulation beteiligt. Schlüsselproteine des RISC sind die Argonautproteine. Im menschlichen Genom existieren vier Klassen von Argonautproteinen (AGO I - IV).[29] All diese Isoformen sind an der Repression der Translation beteiligt.[30] Eine andere wichtige Proteinklasse, die an der RNA-Interferenz teilnimmt, ist die GW182-Proteinfamilie. Diese Proteine sequestrieren mit RISC und der Ziel-mRNA in cytosolischen Kompartimenten, welche man P-Körper nennt. Ob die Sequestrierung der RNA-Duplexe in P-Körpern die Ursache der Regulation oder eine Folge dessen ist, ist noch nicht vollständig geklärt.[31]

Drei mögliche Wege der Regulation der Proteinsynthese durch miRNAs werden postuliert. Der erste Weg besteht in der direkten Spaltung der mRNA an der Stelle der Bindung der miRNA. Dieser Weg ist vor allem typisch für pflanzliche Zellen.[32] Für die Spaltung der mRNA ist eine nahezu perfekte Komplementarität der miRNA zur jeweiligen Ziel-mRNA notwendig. Einzelne nicht komplementäre Basenpaare können dabei toleriert werden. In humanen Zellen spielt der Weg der direkten Spaltung nur eine untergeordnete Rolle, da die mRNAs in der Regel keine perfekte Komplementarität aufweisen.[33] Bislang wurde nur die humane miRNA-196a beschrieben, die eine fast perfekte Basenpaarung mit der mRNA HOXB8 eingeht und diese durch enzymatische Spaltung reguliert.[34] Dementsprechend zeigt nur eine Isoform der AGO-Proteinfamilie, Ago2, katalytische Aktivität. Sie ist für die direkte Spaltung der mRNA verantwortlich.[35] Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP), welche im Bindungsbereich der miRNAs liegen, beeinflussen die Bindung und können zu einer interindividuellen Änderung der Expression der Ziel-mRNA führen.[36]

Ein weiterer Weg der Regulation des Proteoms wird durch Repression der Translation erreicht. Die ersten Studien zu diesem Thema zeigten, dass miRNAs kaum Einfluss auf die

mRNA-Quantität besitzen, sondern nur die Translation inhibieren. Einige Studien, die diesen Weg postulierten, deuteten darauf hin, dass die Proteinsynthese nach der Initiation der Translation stattfindet.[37, 38] Die regulierten mRNAs kosedimentierten in der Zuckergradienten-Zentrifugation mit Polyribosomen, weshalb davon ausgegangen wurde, dass die Inhibition zu einem Zeitpunkt nach der Initiation stattfand.[39] Außerdem konnte gezeigt werden, dass miRNAs zu einem vorzeitigen Beenden der Transkription und einer Dissoziation der Ribosomen noch vor dem eigentlichen Stopp-Codon führten.[40] Andere Arbeiten wiederum belegten, dass die inhibierte mRNA nicht mit Polyribosomen kosedimentierte.[41] Diese Studien deuteten darauf hin, dass die Repression zum Zeitpunkt der Initiation der Translation stattfindet. Mathonnet et al. fanden heraus, dass eine 5'-cap-Struktur für die Repression erforderlich ist und dass die Repression durch Interaktion mit dem Cap-bindenden Komplex eIF4F zustande kommt.[42] Eine andere Studie zeigte eine mögliche Interaktion mit dem Initiationsfaktor eIF4E. Die Assoziation der beiden Ribosomen zu einem fertigen 80S-Ribosom wird vermutlich durch RISC kontrolliert.[43]

Außerdem wurde ein dritter möglicher Weg entdeckt. Mehrere Veröffentlichungen wiesen daraufhin, dass die miRNAs sehr wohl einen Einfluss auf das mRNA-Niveau haben können.[44] Der Bindung der miRNA folgt die Destabilisierung und Degradierung der mRNA.[45] Der erste Schritt in der Degradierung der mRNA erfolgt durch Abspaltung des Poly(A)-Schwanzes.[46] An der Deadenylierung der mRNA ist der CCR4-NOT-Komplex beteiligt. Auch nicht adenylierte mRNAs werden von miRNAs durch Degradierung reguliert. Für diese mRNAs besteht der erste Schritt in der Abtrennung der 5'-Cap-Struktur. Beide Schritte werden durch die Degradierung der mRNA gefolgt.[47]

All diese Berichte legen nahe, dass die Kontrolle der Proteinsynthese durch miRNAs ein komplexer Vorgang ist, der sowohl die Repression der Translation als auch die Degradierung der mRNA beinhalten kann.[48] Entgegen der bisherigen Auffassung, dass miRNAs die Inhibition der Translation bedingen, konnten zwei andere Berichte zeigen, dass miRNAs nicht nur einen inhibitorischen Effekt auf die Proteinsynthese haben können, sondern die Translation steigern können. Auch dies geschieht sequenzspezifisch durch Bindung an AU-reichen Regionen in der 3'-UTR oder der 5'-UTR.[49, 50]

## 1.2. Die microRNA-155

Das Gen MIR155HG (*miR-155 Host Gene*), welches für die miR-155 kodiert, liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 21 (Gen-Lokus 21q21.3). Es wird auch als BIC (*B cell Integration Cluster*) bezeichnet. Dieses nicht proteinkodierende Gen wurde zunächst bei Vögeln als Ort der Integration für das Vogelleukose Virus (ALV) beschrieben.[51] Erst später konnte die miR-155 als Produkt des Gens identifiziert werden.[52, 53] Das Gen beinhaltet eine typische TATA-Box zur Bindung der RNA-Polymerase sowie Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (*Activator Protein*), c-ETS und NF- $\kappa$ B.[53, 54] NF- $\kappa$ B ist vor allem an der Regulation des Immunsystems beteiligt. Eine weitere Bindungsstelle bindet die Transkriptionsfaktoren der SMAD-Proteinfamilie, die die Synthese von TGF $\beta$ -abhängigen (*Transforming Growth Factor*) Genen regulieren. Somit wird auch die Expression von BIC (MIR155HG) durch TGF $\beta$  induziert.[55]

Die miR-155 spielt im Immunsystem eine wichtige Rolle. Der Antigenkontakt von Lymphozyten und Makrophagen führt zu einer starken Induktion der BIC-Expression.[53, 56] Auch die Reifung der naiven Immunzellen und die Keimzentrumsreaktion ist auf BIC/miR-155 angewiesen.[57–59] Die miR-155 scheint an der akuten GVHD (*Graft-Versus-Host-Disease*) nach Stammzelltransplantation beteiligt zu sein.[60]

Auch in der Reifung antigenpräsentierender Zellen spielt die miR-155 eine große Rolle.[61] Die miR-155 hemmt in dendritischen Zellen eine überschießende Immunantwort durch Hemmung der Produktion von IL-1.[62] Außerdem wurde in dendritischen Zellen erstmals gezeigt, dass auch die miR-155\* (miR-155-3p), die weitestgehend komplementär zur miR-155 (miR-155-5p) ist und aus der selben pre-miRNA prozessiert wird, ebenfalls eine Wirkung besitzt und die Funktion der miR-155 teilweise antagonisiert.[27]

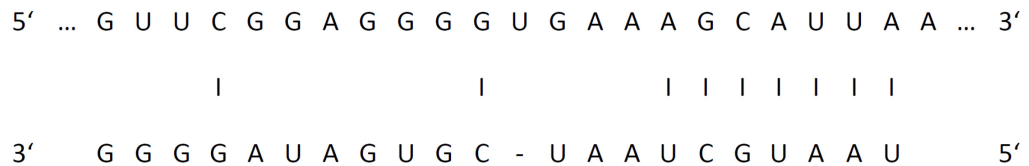
Neben der Funktion im Immunsystem konnte gezeigt werden, dass die miR-155 in vielen soliden Tumoren, aber auch hämatologischen Erkrankungen dereguliert ist. So konnte eine vermehrte Expression in Mammakarzinomen, Zervixkarzinomen und Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden.[63–65] Im Falle des Mammakarzinoms waren hohe Expressionswerte der miR-155 auch mit einem schlechteren Überleben sowie einem höheren Entdifferenzierungsgrad und Stadium der Erkrankung assoziiert.[63] Bei Patienten mit Bronchialkarzinom zeigten sich höhere Expressionswerte bei fortgeschrittenem Stadium.[65] In soliden Tumoren scheint die miR-155 eine Rolle bei der durch TGF $\beta$  induzierten Migration und Metastasierung von Zellen zu spielen.[55]

Im Blut ist die miR-155 in allen gesunden kernhaltigen Populationen nachweisbar. Sowohl myeloische als auch lymphatische Zellreihen exprimieren die miR-155.[66] Eine hohe Expression wurde in pluripotenten HSZ gefunden.[67] In vielen hämatologischen Neoplasien wurde eine hohe Expression der miR-155 nachgewiesen.[52, 68, 69] Besonders stark ist die miR-155 in diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) exprimiert.[70] In Burkitt-Lymphomen (BL) war die miR-155 nur in den Fällen erhöht, die eine latente Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) aufwiesen.[71, 72]

In Zellen der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) fand sich ebenfalls eine hohe Expression der miR-155 im Vergleich zu gesunden B-Lymphozyten.[73–75] Analysen des Genoms zeigten, dass die Kopieanzahl des Gens BIC nicht verändert war und dass eine Amplifikation nicht stattgefunden hatte. Die vermehrte Expression kommt somit vermutlich durch eine Fehlregulierung auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene zustande.[76]

Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der miR-155 in reifen Lymphozyten zu einer lymphoproliferativen Erkrankung führt.[77] Eine Überexpression der miR-155 in HSZ führt hingegen zu einer Expansion der Granulozyten und Monozyten im Knochenmark mit Dysplasien. AML-Patienten weisen eine höhere Expression der miR-155 im Knochenmark auf als gesunde Probanden.[56] Aus diesen Untersuchungen ergibt sich die Frage nach der Expression der miR-155 in unterschiedlichen Leukämieentitäten und deren Einfluss auf das Zellwachstum.

Schon viele Gene, deren Expression durch die miR-155 reguliert werden, konnten identifiziert werden.[57] SHIP1, eine Phosphatase, welche die enzymatische Hydrolyse des Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphates katalysiert, konnte als Zielgen identifiziert werden.[78, 79] SHIP1 als Zielgen der miR-155 ist dabei besonders interessant, da eine alleinige Suppression von SHIP1 in HSZ zu einer myeloproliferativen Erkrankung, ähnlich wie bei Überexpression der miR-155, führt.[78] Die Bindungsstelle der miR-155 mit der mRNA von SHIP1 ist in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 2: Bindungsstelle der miR-155 mit der mRNA von SHIP1[79]**

Die Grafik zeigt die Bindungsstelle der miR-155 mit der mRNA von SHIP1.

Möglicherweise bildet die miR-155 ein wichtiges Verbindungsstück zwischen Entzündungsreaktionen und Krebs und die Induktion in Entzündungsprozessen besitzt vermutlich eine onkogene Wirkung.[80]

### 1.3. Akute Leukämien

Akute Leukämien sind maligne Erkrankungen des blutbildenden Knochenmarks, die durch eine enthemmte Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen und einer blockierten Differenzierung zu reifen Zellen gekennzeichnet sind. Im Gegensatz zu chronischen Leukämien, die einen jahrelangen Verlauf zeigen, führen akute Leukämien unbehandelt innerhalb weniger Wochen bis Monaten zum Tod. Die ungehemmte Proliferation der malignen Zellen führt zu einer Verdrängung des gesunden Knochenmarks. Die Abnahme der gesunden, funktionstüchtigen Zellen im Blut bestimmen die klinischen Symptome und machen den tödlichen Charakter der Erkrankung aus.

Je nach Differenzierung in Zellen der myeloischen oder der lymphatischen Reihe unterscheidet man akute lymphatische von akuten myeloischen Leukämien. Beide lassen sich durch morphologische, immunhistochemische und durchflusszytometrische Techniken weiter unterteilen.

Während in der Erforschung und Behandlung der akuten Leukämien im Kindesalter in den vergangenen Jahren rasante Fortschritte gemacht wurden und heute ca. 90 Prozent aller Kinder in entwickelten Ländern dauerhaft geheilt werden können, sind die Erfolge in der Behandlung Erwachsener mit einer akuten Leukämie noch unbefriedigend.[81] Etwa 80 Prozent der erwachsenen Patienten mit AML erreichen zwar eine komplette Remission (CR), was bedeutet, dass leukämische Blasten in Blut und Knochenmark nicht mehr nachgewiesen werden können. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) beträgt dennoch nur etwa 40 Prozent,

was an der hohen Rezidivrate liegt.[82] Innovative Behandlungsmethoden, wie die allogene Stammzelltransplantation, können die 5-JÜR auf nahezu 60 Prozent steigern.[83]

Es konnten bisher verschiedene Auslöser einer Leukämie identifiziert werden. Neben ionisierender Strahlung scheinen auch Benzole verantwortlich zu sein. Die genauen pathogenetischen Zusammenhänge sind jedoch noch ungeklärt. Es wird jedoch eine *multi-step*-Genese mit mehreren genetischen Schädigungen bis zur Entwicklung des malignen Zellklons angenommen. Eine vorangegangene maligne Erkrankung, welche mit Zytostatika behandelt wurde, stellt einen weiteren Risikofaktor für die Entwicklung einer Leukämie dar. Patienten mit angeborenen genetischen Syndromen, wie beispielsweise dem Down-Syndrom (Trisomie 21) oder der Fanconi-Anämie (Chromosomenbruchsyndrom), zeigen auch eine erhöhte Inzidenz für diese Erkrankung. Akute Leukämien, die nach zytostatischer Therapie, sowie solche, die auf dem Boden eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS) oder eines Myeloproliferativen Syndroms (MPS) entstehen, werden als sekundäre Leukämie bezeichnet und den primären Leukämien gegenübergestellt.

Nach den aktuellen Kriterien der WHO wird die Diagnose einer akuten Leukämie gestellt, wenn sich mehr als 20 Prozent leukämische Blasten im Knochenmark befinden und sich diese der myeloischen oder der lymphatischen Reihe zuordnen lassen.[84] Im Folgenden sollen die akute myeloische und lymphatische Leukämie näher betrachtet werden.

### *1.3.1. Akute lymphatische Leukämien*

Die Blasten der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) zeigen eine Differenzierungstendenz, die der Lymphopoese entspricht. Es können Zellen der B- sowie der T-Zellreihe betroffen sein. Insgesamt ist die akute lymphatische Leukämie eine seltene Erkrankung. Sie kommt heute mit einer Inzidenz von 1,5 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr bezogen auf alle Altersgruppen vor. Zwei Häufigkeitsgipfel lassen sich erkennen. Der Erste liegt im Kindesalter zwischen dem zweiten und fünften Lebensjahr und stellt in dieser Altersgruppe mit einem Anteil von ca. 25 Prozent die häufigste maligne Erkrankung dar. Nach dem 60. Lebensjahr steigt die Inzidenz erneut an und zeigt hier einen weiteren Häufigkeitsgipfel um das 80. Lebensjahr.

Die Einteilung der ALL erfolgt durch Immunphänotypisierung. Nachfolgende Tabelle zeigt die ALL-Subtypen, die charakteristischen Oberflächenmarker sowie deren Inzidenzen im Erwachsenenalter.

**Tabelle 1: ALL-Subtypen[85]**

Subtyp	Marker	Inzidenz
<b>B-Vorläufer-ALL</b>	HLA-DR+, CD19+ u./o. CD79a+, CD22+	72 %
Pro-B-ALL	Keine zusätzlichen Marker	11 %
Common-B-ALL	CD10+	49 %
Prä-B-ALL	CD10+/-, cyIgM+	12 %
<b>Reife B-ALL</b>	sIgM+, CD10+/-	4 %
<b>T-Linien-ALL</b>	cy o. sCD3+, CD7+	24 %
Frühe T-ALL	CD2-, sCD3-, CD1a-	6 %
Thymische T-ALL	CD2+, CD5+, CD1a+, sCD3+/-	12 %
Reife T-ALL	CD2+, CD5+, CD3+, CD1a-	6 %

Für die Prognose und nicht zuletzt die Therapieentscheidung von Patienten mit ALL spielt die Identifizierung prognostischer Faktoren eine große Rolle. Das Alter, die Leukozytenzahl bei Diagnose und der Immunphänotyp sind klinische Faktoren, die klassischerweise für die Einteilung in Risikogruppen genutzt werden. Diese prognostischen Faktoren werden jedoch zunehmend durch zytogenetische und molekularbiologische Faktoren ersetzt. Die folgende Tabelle zeigt zytogenetische Faktoren, welche in multizentrischen Studien als prognostisch relevant identifiziert wurden.



**Tabelle 2: Zytogenetische Risikofaktoren nach Rowe[86]**

Risikogruppe	Aberration
Günstige Prognose	Starke Hyperdiploidie, del(9q)
Ungünstige Prognose	t(9;22), t(4;11), t(8;14), Schwache Hypodiploidien/Fast Triploidie, Komplexer Karyotyp
Uneindeutige Datenlage	t(1;19)

Über die zytogenetischen Faktoren hinaus sind molekularbiologische Faktoren identifiziert worden, die einen Einfluss auf die Prognose haben. Aktivierende Mutationen des NOTCH1- oder des FCBW7-Gens sind mit einer günstigen Prognose assoziiert. Außerdem könnten sie in Zukunft einen prädiktiven Wert bekommen, da sie einen Signalweg aktivieren, welcher durch Gamma-Sekretase-Inhibitoren selektiv gehemmt werden kann. Die Mutation des BAALC-Gens ist ein prognostisch ungünstiger Faktor, sowohl in B-ALL als auch in T-ALL. Auch die Deletionen oder Mutation des IKAROS-Zinkfinger1-Gens (IKZF1) gehen mit einer ungünstigen Prognose bei der B-ALL einher.[86]

### *1.3.2. Akute myeloische Leukämien*

Akute myeloische Leukämien (AML) sind überwiegend Erkrankungen des Erwachsenenalters. Die Jahresinzidenz beträgt 2,5 Fälle pro 100.000 Einwohner. Mit 80 Prozent stellt die AML die häufigste Form der akuten Leukämien im Erwachsenenalter dar.

Akute myeloische Leukämien werden nach der FAB-Klassifikation in acht Untergruppen (M0–M7) unterteilt. Der Subtyp M0 wird als minimal differenzierte AML bezeichnet und ist nur immunphänotypisch den AML zuzuordnen. Die nachfolgende Tabelle gibt die Untergruppen der AML sowie deren Inzidenzen wieder.

**Tabelle 3: FAB-Klassifikation der AML**

Subtyp	Morphologisches Bild	Inzidenz
M0	Minimal differenzierte AML	5–10 %
M1	AML ohne Ausreifung	10–20 %
M2	AML mit Ausreifung	30–45 %
M3	Akute Promyelozyten-Leukämie (APL)	5–10 %
M3 V	Variante mikrogranuläre APL	
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	20 %
M4 Eo	Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie	
M5	Akute monozytäre Leukämie	10 %
M6	Akute Erythroleukämie	5 %
M7	Akute megakaryozytäre Leukämie	5 %

Die Einteilung der WHO orientiert sich dagegen mehr an klinischen Aspekten und bezieht die Ätiologie der Leukämien mit ein. Diese Einteilung hat sich in der Praxis als aussagekräftiger erwiesen, weshalb die morphologische Einteilung der FAB mehr und mehr in den Hintergrund gerät. Die folgende Tabelle zeigt die vier Gruppen der akuten Leukämien, die von der WHO unterschieden werden.[84]

**Tabelle 4: WHO-Klassifikation der AML[84]**

Subtyp	Beschreibung
I	AML mit definierten zytogenetischen Aberrationen
II	AML mit MDS ähnlichen Veränderungen
III	Therapiebedingte AML und MDS
IV	Andere Formen der AML (z. B. einige FAB-Subtypen)

Auch die AML wird in verschiedene Risikogruppen eingeteilt, welche nicht zuletzt für die Therapieentscheidung bedeutend sind. Schon länger als bei den ALL erfolgt die Einteilung anhand von zytogenetischen Aberrationen und molekularen Markern. Diese zytogenetischen

Aberrationen und molekularen Auffälligkeiten wurden in multizentrischen Studien als prognostisch bedeutend identifiziert. In der nachfolgenden Tabelle ist die Einteilung der AML in prognostische Risikogruppen nach Grimwade und Hills zusammengestellt.

**Tabelle 5: Risikogruppen nach Grimwade und Hills[87]**

Risikogruppe	Aberrationen
Günstige Prognose	t(15;17), t(8;21), inv(16)
Intermediäre Prognose	Normaler Karyotyp oder andere Aberrationen
Ungünstige Prognose	abn(3), inv(3), add(5q), del(5q), add(7q), t(6;11), t(10;11), t(9;22), abn(17p), -5, -7, -17, komplexer Karyotyp ( $\geq 3$ Aberrationen)

Auch bei der AML sind molekularbiologische Faktoren beschrieben worden, die einen Einfluss auf die Prognose haben. Nukleophosmin 1 (NPM1) ist ein Protein, welches am Transport ribosomaler RNAs in das Zytoplasma beteiligt ist. Die Mutation dieses Gens ist mit einer günstigen Prognose assoziiert. Auch die Mutation des Transkriptionsfaktors CEBPA deutet auf eine günstige Prognose hin. Die Tyrosinkinase *fms like tyrosinkinase 3* (FLT3) ist ein membranständiger Rezeptor, welcher durch den FLT3-Liganden aktiviert wird. Eine Interne Tandemduplikationsmutation (ITD-Mutation) dieser Tyrosinkinase steht im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose.[87]

#### 1.4. Zielstellung

miRNAs stellen eine Klasse von Molekülen dar, die seit ihrer Entdeckung im Jahr 1993 intensiv erforscht werden. Sie bieten einen vielversprechenden Ansatzpunkt für neue Therapien und Medikamente unterschiedlichster Krankheiten, da sie einen Einfluss auf viele Signalwege und Stoffwechselprozesse der Zelle haben. Bereits in jüngster Zeit wurden Berichte über den therapeutischen Einsatz von miRNAs *in vivo* veröffentlicht.

In malignen Erkrankungen sind miRNAs häufig dereguliert. Durch die Dysregulation der miRNAs können Proliferationsrate und Differenzierungsvorgänge der malignen Zellen ungünstig beeinflusst werden. Die medikamentöse Beeinflussung der Expression dieser

miRNAs könnte einen Weg bieten, die gestörten Signalwege gezielt zu steuern und damit in das Zellwachstum einzugreifen. Außerdem ist die Einteilung der Patienten in entsprechende Risikogruppen für die Therapieentscheidung von entscheidender Bedeutung. Die Identifizierung neuer prognostischer Faktoren spielt daher eine herausragende Rolle hin zu einer individualisierten Therapie.

Die Bedeutung der miR-155 in akuten lymphatischen Leukämien ist bislang nicht untersucht worden. Die Bedeutung für andere hämatologische Erkrankungen, wie das Hodgkin- bzw. das Burkitt-Lymphom, sind jedoch durch einige Studien belegt. Auch ein prognostischer Wert wurde der miR-155 z.B. beim Bronchialkarzinom zugeschrieben. Um die Kenntnisse über die biologische Bedeutung der miR-155 in Zellen der akuten myeloischen und lymphatischen Leukämie zu erweitern, wurde ein Arbeitsprogramm geplant, das zum einen die Expression der miR-155 in verschiedenen Leukämiezelllinien, zum anderen den Einfluss der Hemmung bzw. Überexpression der miR-155 auf das Wachstum von Zelllinien untersuchen sollte. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Expression der miR-155 durch neuartige Medikamente zu beeinflussen ist. Außerdem wurde die Expression der miR-155 in *de novo*-Leukämiezellen von Patienten der eigenen Abteilung mit klinischen Daten verglichen, um Aussagen über einen möglichen Einfluss auf die Prognose zu untersuchen.

Die Arbeit stellt den Versuch einer ersten systematischen Untersuchung der Funktion der miR-155 in akuten lymphatischen Leukämien und eine logische Erweiterung des Wissens über ihre Expression in akuten myeloischen Leukämien dar. Sie ist eine auf den neuesten Erkenntnissen in dem innovativen Gebiet der miRNA-Forschung fußende Darstellung des Einflusses dieser Stoffwechselregulation in Zellen der akuten Leukämie.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
2-Propanol	JT Baker
6-Aminohexansäure	Roth
Ammoniumchlorid	Merck
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Roth
BSA	Serva
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth
Chloroform	JT Baker
DMSO	Sigma
EDTA	Merck
Ethanol, unvergällt	Universität Rostock, Zentralapotheke
Ethanol, vergällt	Universität Rostock, Zentralapotheke
Glycin	Roth
Methanol	Labscan Analytical Sciences
Milchpulver	Roth
Natriumchlorid	Roth
Nukleasefreies Wasser	Ambion
Propidiumiodid	Merck
Salzsäure	Universität Rostock, Zentralapotheke
SDS	Serva
TEMED	Sigma
Tris Base	Roth
Triton X-100	Sigma
Trypanblau	Sigma
WST-1	Roche

*2.1.2. Kits, Fertiglösungen und Enzyme*

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Bestellnummer</u>
2x qPCR MasterMix Plus dNTP	Eurogenetec	05-QPZX-03+WOUN
Annexin V Binding Buffer	BD Pharmingen	556454
Annexin V FITC Apoptosekit	BD Pharmingen	556419
Biocoll	Biochrom	L6115
Complete-Mini EDTA free dNTP	Roche Pharmacia Biotech	04693159
ECL Prime Western Blot Detection Reagent	EG Healthcare	RPN2133
ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific	46430
miRNeasy Mini Kit (50)	Qiagen	217004
PBS	Biochrom	L1825
PhosSTOP	Roche	04906837
PKH26GL	Sigma	PKH26GL
Ponceau S	Serva	33427
Precision Protein Kaleidoskop	BioRad	161-0375
Rnase-Free DNase Set (50)	Qiagen	79254
Restore Plus Western Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific	46430
Sorafenib	Bayer Pharm. Div.	S-8502
Restore <sup>TM</sup> Plus W B Stripping Buffer	Thermo Scientific	46430
Superscript II	Invitrogen	18064-014
TaqMan <sup>®</sup> microRNA Assay hsa-miR-155	Applied Biosystems	4427975
TaqMan <sup>®</sup> microRNA Assay RNU48	Applied Biosystems	4427975
TaqMan <sup>®</sup> miRNA Rev. Transcription Kit	Applied Biosystems	4366597
TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Assay BIC	Applied Biosystems	4331182

*2.1.3. Nährmedien und Antibiotika*

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Bestellnummer</u>
alpha MEM	PAA Laboratories	E15-862
FKS, hitzeinaktiviert	PAA Laboratories	A15-151
IMDM mit L-Glutamin	PAA Laboratories	E15-819
Mykokill AB	PAA Laboratories	P11-016
Penicillin Streptomycin (10000 U/ml)	Biochrom	A2213
RPMI 1640	Biochrom	FG1215

*2.1.4. Geräte und Materialien*

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
6-, 24- und 96-Lochplatten	Greiner
Micro Amp 96 well reaction plate	Applied Biosystems
ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems
Abzug X-Line	Vallox
Agarosegelkammer	BioRad
AutoMACS und Zubehör	Miltenyi Biotech
Avanti 30 Centrifuge	Beckmann
Brutschrank BB6220 Cu	Heraeus Instruments
Captair Chem	Erlab
Chambered Coverglass System	Nunc
Chromatographiepapier	Whatman
Dri-Block DB 3	Techne
ep Dualfilter Tips	Eppendorf
FACSCalibur	Becton & Dickinson
Falcon Tubes 5 ml	Becton & Dickinson
Geldokumentationssystem	Herolab
Gene Pulser Cuvettes 0,4 cm	BioRad
Gene Pulser Xcell	BioRad
GFL 1083	GFL
Hera Safe	Heraeus Instruments
Image Station 440	Kodak
Lasermikroskop LSM 410	Carl Zeiss Jena

Mikroskop Eclipse TE 200	Nikon
Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad
NanoDrop ND1000	Peqlab
Neubauerzählkammer	Blau Brand
PCR Tubes 0,5/0,2 ml	Eppendorf
Pipettensatz (10/20/100/1000 µl)	Eppendorf
Plattenphotometer HT3	Anthos
PVDF-Membran	GE Healthcare
Rotina 35 R	Hettich
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf
Semi-Dry-Blotter Fastblot B34	Biometra
Sonopuls HD 2070	Bandelin
Sprout Minizentrifuge	Biozym
Thermal Cycler C1000™	BioRad
Thermomixer comfort	Eppendorf
Zellkulturflaschen 25/75 cm²	Greiner

### 2.1.5. Puffer und Lösungen

<u>Lösung</u>	<u>Bestandteil</u>	<u>Konzentration</u>
1 x TBST (pH 8,0)	Natriumchlorid	0,15 M
	Tris Base	0,01 M
	Triton X-100	0,05 Vol %
Anode I Puffer (pH 10,4)	Tris Base	0,03 M
	Methanol	20 Vol %
Anode II Puffer (pH 10,4)	Tris Base	0,3 M
	Methanol	20 Vol %
Kathodenpuffer (pH 9,4)	Tris Base	0,025 M
	6-Aminohexansäure	0,04 M
	Methanol	20 Vol %
RIPA-Lyse-Puffer	Tris (pH 7,4)	50 mM
	Natriumchlorid	150 mM
	SDS	0,1 %
	NP 40	1 Vol %



2 x Probenpuffer	SDS	0,15 M
	Glycerin	22 Vol %
	EDTA	1 mM
	Sammelgelpuffer	25 Vol %
	Bromphenolblau	1 Spatelspitze
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	Tris Base	0,5 M
	SDS	0,14 mM
Trenngelpuffer (pH 8,8)	Tris Base	1,5 M
	SDS	0,14 mM
Elektrophoresepuffer	Tris Base	75 mM
	Glycin	0,5 M
	SDS	10 mM
0,5 x TBE	Tris Base	0,45 M
	Borsäure	0,045 mM
	EDTA	0,1 M

### 2.1.6. Primer und Oligonukleotide

Oligonukleotid	Hersteller	Bestellnummer
miRCURY™ LNA Knockdown Probe hsa-miR-155 5'-ACC CCT ATC ACG ATT AGC ATT AA-3'	Exiqon	138537-00
miRCURY™ LNA Knockdown Probe Scramble-miR 5'-GTG TAA CAC GTC TAT ACG CCC A-3'	Exiqon	199002-00
miRCURY™ LNA Knockdown Probe 5'-fluorescein 5'-GTG TAA CAC GTC TAT ACG CCC A-3'	Exiqon	199002-04
miScript miRNA Mimic Syn-hsa-miR-155 5'-UUA AUG CUA AUC GUG AUA GGG GU-3'	Qiagen	MSY0000646
AllStars Neg. Control siRNA (20nmol)	Qiagen	1027281
AllStars Neg. siRNA AF 488 (20nmol)	Qiagen	1027292

### 2.1.7. Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Wirt</u>	<u>Klon</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Bestellnummer</u>
Anti-mouse-HRP	Ziege	polyklonal	Invitrogen	81-6520
Anti-rabbit-HRP	Ziege	polyklonal	Cell Signaling	7074
GAPDH (ZG003)	Maus	monoklonal	Invitrogen	39-8600
pAkt (Ser 473)	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling	9271
pAkt (Thr308)	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling	4056
PTEN (138G6)	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling	9559
SHIP1 (C40G9)	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling	2727S
Akt	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling	9272

Antigen	Fluorochrom	Hersteller	Bestellnummer
IgG1	FITC	Beckton & Dickinson	345815
IgG1	PE	Beckton & Dickinson	345816
CD3	PE	Beckton & Dickinson	345765
CD19	FITC	Beckton & Dickinson	345776
CD33	PE	Beckton & Dickinson	345779
CD34	FITC	Beckton & Dickinson	345801
CD45	FITC	Beckton & Dickinson	345808
HLA-DR	FITC	Beckton & Dickinson	347400

## Micro Beads für Zellisolierung

Micro Bead	Hersteller	Bestellnummer
Anti-CD34	Miltenyi Biotec	130-046-702
Anti-FITC	Miltenyi Biotec	130-048-701

## 2.1.8. Zelllinien

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien, Zelltyp und Kulturbedingungen

Name	Zelltyp	Medium
REH	Humane pre-B-Zell-Leukämie	RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % P/S
SEM	Humane pre-B-Zell-Leukämie	IMDM + 10 % FKS + 1 % P/S
RS4;11	Humane pre-B-Zell-Leukämie	$\alpha$ MEM + 10 % FKS + 1 % P/S
Jurkat	Humane T-Zell-Leukämie	RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % P/S
MOLT-4	Humane T-Zell-Leukämie	RPMI 1640 + 20 % FKS + 1 % P/S
HL-60	Humane akute myeloische Leukämie	1640 + 10 % FKS + 1 % P/S
MV4-11	Humane akute monozytische Leukämie	RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % P/S
NB-4	Humane akute promyelozyten Leukämie	RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % P/S
DogKIT	Humanes Burkitt-Lymphom	RPMI 1640 + 10 % FKS + 1 % P/S
DoGum	Humanes Burkitt-Lymphom	RPMI 1640 + 20 % FKS + 1 % P/S
GumBus	Humanes Burkitt-Lymphom	RPMI 1640 + 5 % FKS + 1 % P/S

Die Leukämiezelllinien wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bestellt. Die drei Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien wurden von Prof. Dölken aus Greifswald zur Verfügung gestellt, sind jedoch inzwischen auch bei DSMZ erhältlich. Genauere Angaben zu zytogenetischen Besonderheiten und Herkunft der Zelllinien sind dem Anhang zu entnehmen.

## 2.2. Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Methoden wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Medien wurden vor der Verwendung auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.

### 2.2.1. Zellkultur

Die Suspensionszelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 Prozent CO<sub>2</sub> unter einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre kultiviert. Alle zwei bis vier Tage wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 180 rpm) und der Überstand an altem Medium abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium gelöst und die Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellen je nach Zelllinie in einer Konzentration zwischen 0,5 und  $1,0 \times 10^6$  Zellen pro 1 ml Medium in einer Kulturflasche neu ausgesät.

Für die Zählung der Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Zuvor wurden 10 µl der Zellsuspension mit Trypanblau verdünnt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der intakte Membranen nicht durchdringt und daher nur tote Zellen mit einer geschädigten Zellmembran anfärbt. Vitale Zellen erscheinen im Gegensatz zu toten im Lichtmikroskop daher hell. Blau gefärbte Zellen wurden demnach als tot definiert und nicht mitgezählt.

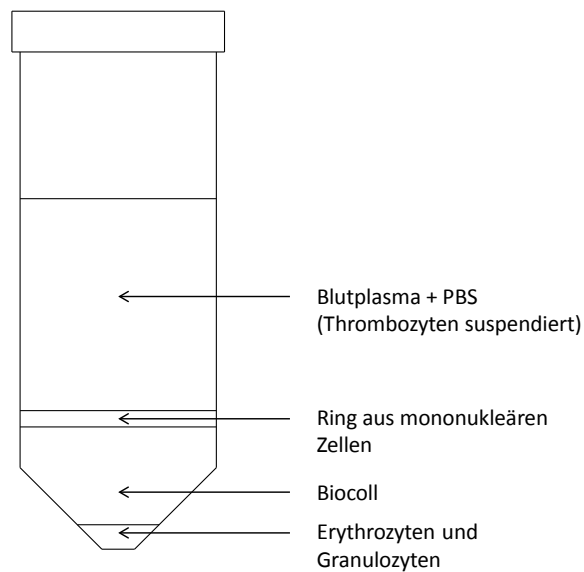
Viable Zellen wurden in einem Stickstofftank in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Dazu wurden  $5,0 \times 10^6$  Zellen in Kryokonservierungsröhrchen in 900 µl Medium suspendiert und darauf 100 µl DMSO (Dimethylsulfoxid) gegeben. DMSO verhindert die Auskristallisierung des Wassers, was zu einem Zerreißen der Zellmembran führen würde. Die Röhrchen wurden zunächst in einem Kasten mit Isopropanol auf -80 °C heruntergekühlt. Isopropanol ermöglicht die langsame Abkühlung um 1 °C pro Stunde. Nach Erreichen der Temperatur wurden die Röhrchen in einen Stickstofftank überführt.

Zum Auftauen der viabel eingefrorenen Zellen wurde die gefrorene Zellsuspension in frischem Kompletmedium zwei Mal bei 180 g gewaschen (4 °C, 10 min). Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen in Kompletmedium in einer Zellkulturflasche ausgesät. Die Lymphom-Zelllinien wurden nach dem Auftauen zunächst in einer 6-Lochplatte ausgesät und erst nach einigen Tagen in eine kleine Zellkulturflasche umgesetzt.

### 2.2.2. Isolierung von mononukleären Zellen aus Blut und Knochenmark

Zu den peripheren mononukleären Zellen (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) gehören Lymphozyten, Monozyten und Natürliche Killerzellen. Auch maligne Leukämiezellen (Blasten) finden sich in dieser Zellgruppe. Die Zellen wurden aus dem Blut bzw. Knochenmark von gesunden Probanden und Patienten gewonnen. Alle Probanden und Patienten hatten sich zuvor mit der wissenschaftlichen Untersuchung ihres Blutes einverstanden erklärt bzw. die Zellen wurden aus überschüssigem Untersuchungsmaterial gewonnen. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen (1,6 mg/ml) abgenommen.

Die Isolierung der PBMC erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Zunächst wurde die gesamte Probe im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Danach wurde die gleiche Menge Biocoll mit der Zellsuspension überschichtet. Biocoll besitzt eine Dichte von 1,077 g/l und ist damit geeignet Zellpopulationen mit unterschiedlicher Dichte voneinander zu trennen. Durch die Zentrifugation (12 min, 4 °C, 1.200 g, ungebremst) trennten sich die unterschiedlichen Zellpopulationen voneinander. Erythrozyten und polymorphkernige Leukozyten (Granulozyten) haben eine höhere Dichte als Biocoll und pelletieren daher am Boden des Reaktionsgefäßes. Oberhalb des Biocolls bildet sich ein Ring aus mononukleären Zellen (PBMC). Thrombozyten bleiben im Blutplasma, welches die oberste Phase bildet, zurück.



**Abbildung 3: Zellpopulationen nach Dichtezentrifugation mit Biocoll**

*Schematisch dargestellt ist ein Reaktionsgefäß mit den nach Dichtezentrifugation entstehenden Zellpopulationen.*

Nach der Zentrifugation wurde der Zellring mit den mononukleären Zellen aus dem Reaktionsgefäß mittels Pasteurpipette extrahiert und zwei Mal in PBS gewaschen. Stellte sich nach dem Waschen ein rötliches Pellet dar, wurde eine Lyse der verbliebenen Erythrozyten angeschlossen. Das Pellet wurde dafür in 10 ml 0,25 M Ammoniumchloridlösung ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) resuspendiert und für 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zwei Mal in PBS gewaschen.

Hierauf erfolgte die Resuspension des Zellpellet in PBS und die Bestimmung der Zellzahl. Maximal  $1,0 \times 10^7$  und mindestens  $1,0 \times 10^5$  Zellen wurden für die Isolierung der RNA eingesetzt und in 700  $\mu\text{l}$  Qiazol Lyse-Reagens lysiert (siehe 2.3.1).

### 2.2.3. Gewinnung von B-Lymphozyten aus PBMCs

Mittels magnetischer Zellseparation (*Magnetically Activated Cell Separation*) am AutoMACS (Miltenyi Biotech) lassen sich Zellen mit spezifischen Oberflächenmolekülen anreichern. Hierzu wurden  $1 \times 10^8$  PBMC von gesunden Spendern in 300  $\mu\text{l}$  MACS-Running Puf-

fer (MRB) suspendiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen CD19, welche mit dem Farbstoff FITC markiert waren. Pro  $1,0 \times 10^6$  erwarteter Zielzellzahl wurden 10  $\mu\text{l}$  Antikörper verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C im Dunkeln für 15 min. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen erneut in MRB aufgenommen. Anschließend wurde ein mit Magnetpartikeln (*Micro Beads*) beladener Sekundärantikörper, der den Farbstoff FITC bindet, in die Zellsuspension gegeben und die Suspension für 15 min bei 4 °C inkubiert. Je  $1,0 \times 10^7$  Gesamtzellen in der Suspension wurden 10  $\mu\text{l}$  Sekundärantikörper eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen nochmals in MRB gewaschen. Die Anreicherung erfolgte dann am Auto-MACS. Die Ausbeute und die Reinheit der gewonnenen Zellsuspension wurden schließlich mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

#### 2.2.4. Isolierung hämatopoetischer Stammzellen aus Knochenmarkpunktat

Hämatopoetische Stammzellen wurden aus dem Knochenmark von Patienten isoliert. Es wurde nur solches Knochenmark verwendet, welches morphologisch als auch durchflusszytometrisch keine Infiltration durch maligne Zellklone zeigte. Das Punktat wurde zunächst wie Blut aufgearbeitet und eine Dichtezentrifugation durchgeführt (siehe 2.2.2). Die mononukleären Zellen wurden weiterverwendet um die hämatopoetischen Stammzellen zu isolieren. Hämatopoetische Stammzellen wurden als  $\text{CD}34^+/\text{CD}45^+$ -Zellen definiert.

Die zuvor angereicherten mononukleären Zellen wurden in 300  $\mu\text{l}$  MRB pro  $1,0 \times 10^8$  Zellen aufgenommen und mit 100  $\mu\text{l}$  *Blocking Reagent* und 100  $\mu\text{l}$  *CD34-MicroBeads* versetzt. Für 30 min wurden sie bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen in MRB gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in MRB aufgenommen und im AutoMACS sortiert. Proben aus der Zellsuspension vor der Separation sowie aus der positiven und der negativen Fraktion wurden entnommen, um die Ausbeute und die Reinheit der Proben am Durchflusszytometer zu bestimmen. Die Positivfraktion wurde in ein Reaktionsgefäß übertragen, abzentrifugiert und für die RNA-Isolierung in 700  $\mu\text{l}$  Qiazol Lysereagenz versetzt.

### 2.2.5. Transfektion von Suspensionszellen

Um die Funktion von microRNAs zu untersuchen, wurden Oligonukleotide verwendet. Mittels RNA-Interferenz (RNAi) können miRNAs durch einzelsträngige Oligonukleotide inhibiert werden bzw. die Funktion der miRNA imitieren.

Bei der Elektroporation werden die Zellen einem elektrischen Feld ausgesetzt, was zu einer Entstehung von Poren in der Zellmembran führt. Durch diese Poren können kleine Moleküle wie Oligonukleotide in die Zelle diffundieren.

Für die Transfektion zur Unterdrückung der miR-155 wurden *Antisense*-Oligonukleotide (ASO) verwendet, welche eine zur miRNA komplementäre Basensequenz aufweisen. Die Oligonukleotide waren am Ribosemolekül des RNA-Stranges modifiziert (*Locked Nucleotide Acid*, LNA), was mit einer stabileren RNA und einer erhöhten Bindeaffinität einhergeht. Als Kontrolle wurde Wasser sowie ein unspezifisches Oligonukleotid verwendet. Zur Untersuchung des Einflusses einer hohen Expressionsrate der miR-155 wurden die Zellen mit einer siRNA transfiziert. Ein Strang der doppelsträngigen siRNA entsprach der Sequenz der miR-155. Als Kontrolle diente eine unspezifische siRNA sowie Elektroporationspuffer.

Einen Tag vor der Elektroporation wurden die Zellen mit einer Konzentration von 0,5 bis  $1,0 \times 10^6$  pro ml in frischem Vollmedium ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen zwei Mal in Medium ohne Zusätze gewaschen und in einer Konzentration von  $1,0 \times 10^7$  pro 300  $\mu$ l Medium eingestellt. In eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette wurden 40  $\mu$ l des in Wasser gelösten Oligonukleotides bzw. 40  $\mu$ l Kontrollflüssigkeit vorgelegt. Darauf wurden 300  $\mu$ l der Zellsuspension (entsprechend  $1,0 \times 10^7$  Zellen) gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zelllinien wurden bei 300 V bzw. 250 V (nur MV4-11) und 960  $\mu$ FD in einem Gene Pulser (BioRad) elektroporiert. Danach wurde die Küvette erneut für 10 min auf Eis gestellt.



**Tabelle 7: Transfektionsansatz**

Oligonukleotid	Konzentration	Transfizierte Zellen	Spannung	Kontrolle
Inhibitor (ASO)	25 $\mu$ M (40 $\mu$ l)	1 x 10 <sup>7</sup>	300 V (250 V bei MV4-11)	Wasser
Analogon (siRNA)	20 $\mu$ M (40 $\mu$ l)	1 x 10 <sup>7</sup>	300 V	Elektroporationspuffer

Die transfizierten Zellen wurden in einer 6-Lochplatte in 8 ml frisches Medium ausgesät und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellsuspensionen zu gleichen Teilen auf vier 6-Lochplatten für verschiedene Zeitpunkte aufgeteilt. Die einzelnen Proben wurden mit 4 ml Vollmedium aufgefüllt. Zu den untersuchten Zeitpunkten wurden die Zellen entnommen, abzentrifugiert, gezählt und für die Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate sowie die RNA-Isolierung weiterverarbeitet.

Zur Bestimmung der Transfektionsrate wurden mit einem Fluorochrom markierte LNA-Oligonukleotide bzw. siRNAs verwendet. Diese sind an den Farbstoff Fluorescein (LNA) bzw. Alexa Fluor 488 (siRNA) gekoppelt. Im Durchflusszytometer konnte die Transfektionsrate der so markierten Zellen ermittelt werden. Eine mit Wasser/Elektroporationspuffer elektroporierte Zellprobe wurde als Kontrolle verwendet.

#### 2.2.6. Behandlung von Zellkulturen mit Sorafenib

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 1,5 ml aufgenommen. Danach wurde Sorafenib zu der Zellsuspension gegeben, sodass Konzentrationen von 7,3  $\mu$ M und 0,73  $\mu$ M Sorafenib in den Zellsuspensionen entstanden. Als Kontrolle wurden Zellsuspensionen mit DMSO inkubiert. Mit den behandelten Zellsuspensionen wurden 24-Lochplatten befüllt. Es wurden zwei Vertiefungen mit jeweils 1,5 ml Zellsuspension für jeden zu untersuchenden Zeitpunkt gefüllt. Für die Bestimmung der metabolischen Aktivität wurden außerdem 96-Lochplatten mit 150  $\mu$ l Suspension pro Vertiefung gefüllt. Vertiefungen mit reinem Medium dienten als Kontrolle.

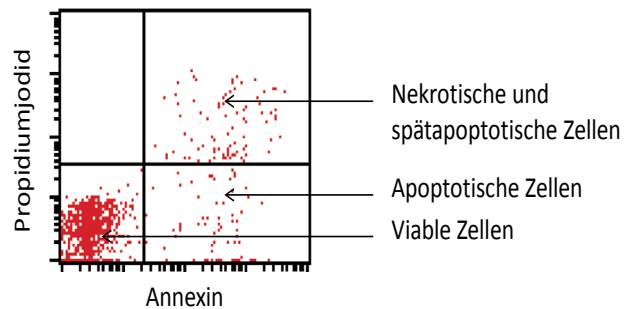
### *2.2.7. Durchflusszytometrie*

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode dar, mit deren Hilfe Zellen charakterisiert werden können. Die Zellen werden durch hydrodynamische Fokussierung einzeln durch ein Röhrchen geleitet und mit einem Laserstrahl bestrahlt. Anhand der Ablenkung des Laserstrahls können Größe und Granularität der Zellen gemessen werden. Außerdem können die Zellen mit intra- oder extrazellulären Farbstoffen, die an Antikörper gebunden sein können, beladen werden. Diese Farbstoffe werden durch den Laserstrahl angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dieses Licht wird als Maß für die Beladung der Zelle mit dem jeweiligen Farbstoff herangezogen.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Messung der Apoptose- und Nekroserate, zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und zur Charakterisierung der Zellen nach ihren Oberflächenmarkern genutzt. Alle Messungen wurden an einem FACSCalibur (Becton & Dickinson) durchgeführt.

#### **2.2.7.1. Bestimmung der Apoptose- und Nekroserate**

Annexin ist ein Protein, welches eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin aufweist, die Zellmembran jedoch nicht zu durchdringen vermag. Phosphatidylserin befindet sich in der Innenseite der Zellmembran und wird im Zuge der Apoptose auf die Außenseite transloziert. Nekrotische Zellen, deren Zellmembran reißt, binden ebenfalls das Protein Annexin. Zellen, die mit Annexin markiert werden können, sind somit apoptotische oder nekrotische Zellen. Um zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterscheiden zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit Propidiumjodid gefärbt, einem Farbstoff, der in die DNA interkaliert. Bei intakter Membran kann der Farbstoff nicht an die DNA binden. In der FACS-Analyse können also vier Populationen unterschieden werden. Die Zellpopulation, welche weder durch Annexin noch durch Propidiumjodid angefärbt wird, beinhaltet alle viablen Zellen. Die Zellen, die nur durch Annexin angefärbt werden, sind frühapoptotische Zellen, Annexin- und Propidiumjodid-positive Zellen gelten als nekrotisch bzw. spätapoptotisch.



#### **Abbildung 4: Auswertung der Apoptose- und Nekroseraten**

Die Abbildung zeigt die durch durchflusszytometrische Messung zu unterscheidenden Zellpopulationen. Jeder Punkt steht für eine gezählte Zelle.

Für die Messung wurden die Zellen in FACS-Röhrchen in Annexin-Binding-Puffer aufgenommen. Dieser Puffer enthält keine Kalziumionen, welche das Binden des Annexins beeinträchtigen würde. Zu den Proben wurden 5 µl Annexin gegeben und die Reaktion nach 10 min Inkubation durch die Zugabe von Annexinpuffer gestoppt. Unmittelbar vor der Messung wurden 15 µl Propidiumjodid (20 ng/ml) zu der Probe gegeben.

#### **2.2.7.2. Bestimmung der Transfektionseffizienz**

Für die Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen wie oben beschrieben mit farbstoffmarkierten Oligonukleotiden transfiziert. Die Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit in PBS gewaschen (180 g; 10 min; 4 °C) und in ein FACS-Röhrchen übertragen. Anschließend wurden die Zellen im FL-1-Kanal gemessen und der Anteil der fluoreszierenden Zellen bestimmt. Kontrollproben, die mit Wasser bzw. Elektroporationspuffer transfiziert worden waren, dienten zur Bestimmung der Autofluoreszenz.

#### **2.2.7.3. Untersuchung der *de novo*-Leukämiezellen**

Für die Bestimmung der Expression von Oberflächenmolekülen wurden die Zellen zunächst in PBS aufgenommen und  $1,0 \times 10^5$  Zellen wurden in einem FACS-Röhrchen in 100 µl PBS suspendiert und mit 10 µl der entsprechenden Antikörper versetzt. Anschließend wurden die Zellen 10 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in PBS gewaschen (180 g; 10 min; 4 °C) und erneut in 400 µl PBS aufgenommen. Genauere Angaben zu den verwendeten Antikörpern sind dem Materialteil zu entnehmen.

### 2.2.8. Bestimmung der Stoffwechselaktivität mittels WST-1-Test

*Water soluble tetrazolium 1* (WST-1) (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) ist ein Farbstoff, der in viablen Zellen durch das Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase-System, welches in den Mitochondrien lokalisiert ist, umgesetzt wird. Eine enzymatische Umsetzung in Formazan führt zu einem Farbumschlag, der in einem Spektralphotometer gemessen werden kann. Durch das Ausmaß des Farbumschlags kann somit auf die Viabilität der Zellen mit funktionierender mitochondrialer Energiegewinnung geschlossen werden.

In einer 96-Lochplatte wurden die Zellen in einer Konzentration von  $5,0 \times 10^4$  Zellen pro 150 µl Medium in Triplets ausgesät. Als Blindwert wurde reines Medium verwendet. Zu der Zellsuspension wurden 15 µl WST-1 pipettiert und vermischt. Nach einer Inkubationszeit von zwei und vier Stunden bei 37 °C und 5 Prozent CO<sub>2</sub> wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm und 650 nm gemessen.

## 2.3. Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1. Isolierung der RNA

Für die RNA-Isolierung wurde das miRNEasy Mini Kit (50) (Qiagen) verwendet. Die Isolierung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

Die Zellen wurden zunächst in einem Reaktionsgefäß mit 700 µl Quiazol-Lysereagenz vollständig lysiert, um die RNA freizusetzen. Danach wurde die Probe bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet. Das Lysat wurde mit 140 µl Chloroform vermischt und bei 12.000 g bei 4 °C für 15 min (Beckmann) zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen. Eine rötliche, phenolhaltige Phase am Boden, eine obere weiße proteinreiche Schicht und eine wässrige Nukleinsäure enthaltende Schicht. Die Nukleinsäuren des klaren Überstandes wurden in einem neuen Reaktionsgefäß mit 600 µl Ethanol gefällt und auf die Silicamembran übertragen. Durch mehrere Waschschrte mit verschiedenen Puffern wurde die RNA aufgereinigt. Zusätzlich wurde ein 15-minütiger DNA-Verdau mit DNase durchgeführt, um eventuelle genomische DNA-Kontaminationen zu entfernen.

Zuletzt wurde die RNA in 2 x 20 µl Wasser eluiert und in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefangen. Bis zur Weiterbearbeitung wurden die RNA-Proben bei -80 °C eingefroren.

### 2.3.2. Messung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA im Eluat wurde an einem Spektralphotometer (NanoDrop ND 1000, PeqLab) durchgeführt. Hierzu wurden 2 µl des Eluates auf die Messoberfläche pipettiert und die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Reinheit der Probe wurde über den Quotienten A260/A280 bestimmt. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 2.3.3. Reverse Transkription

Mit der Reversen Transkription lassen sich zu einer RNA komplementäre DNA-Sequenzen herstellen. Das Produkt dieser Reaktion ist die cDNA.

#### 2.3.3.1. Reverse Transkription kleiner RNAs

Um Sensitivität und Spezifität der Quantifizierung von kleinen RNAs zu verbessern, wurden sogenannte *Stem-loop Primer* verwendet, welche die Affinität zu den jeweiligen RNAs erhöhen. Die Reverse Transkription der kleinen RNAs kann so in der Effektivität gesteigert werden und es können falsch negative und falsch positive Ergebnisse reduziert werden.

Für die Reaktion wurden RNA in einer Konzentration von 1 ng/µl eingesetzt und in ein kleines Reaktionsgefäß pipettiert. Der Reaktionsansatz für die Synthese der cDNA ist in der Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 8: Pipettierschema des Master-Mixes für die RT kleiner RNAs**

Reagenz	Konzentration	Volumen [µl]/ Reaktion
Wasser RNase-frei	-	4,16
RT Primer	-	3,00
RT Puffer	10-fach	1,50
RNase Inhibitor	200 U/µl	0,19
dNTP	100 mM	0,15
MultiScribe RT	50 U/µl	1,00
<b>Total</b>		<b>10,00</b>

Die spezifischen Primer waren Bestandteil des TaqMan miRNA Expression Assay (Applied Biosystems). Die Konzentration der miR-155 wurde im Verhältnis zu einem konstitutionell exprimierten Gen gemessen. Dazu diente die ribosomale RNA RNU48. Der Master-Mix wurde analog angesetzt.

Für die Synthese der cDNA wurden die Proben zunächst für 30 min bei 16 °C, gefolgt von 30 min bei 42 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte für 5 min bei 85 °C. Danach wurde die cDNA bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert.

### 2.3.3.2. Reverse Transkription der gesamten mRNA

Für die Bestimmung der Expression des Gens BIC wurde zunächst die gesamte mRNA in cDNA überschrieben. Dazu wurde die RNA in einem Reaktionsgefäß mit Wasser verdünnt, sodass in 9 µl 10 ng RNA enthalten waren. Dazu wurde 1 µl randomisierte Primer (Qiagen) gegeben und bei 72 °C für 10 min inkubiert und danach auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Master-Mix zugegeben. Der Ansatz des Master-Mixes ist der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

**Tabelle 9: Pipettierschema des Master-Mixes für die RT der mRNA**

Reagenz	Konzentration	Volumen [µl]/ Reaktion
Wasser RNase-frei	-	1,00
First-Strand Puffer	5-fach	4,00
DTT	0,1 M	2,00
dNTP		2,00
SuperScript II RT	200 U/µl	1,00
<b>Total</b>		<b>10,00</b>

Die Reaktionsgefäße wurden bei 42 °C für 1 h inkubiert. Zum Inaktivieren des Enzyms wurden die Proben auf 90 °C für 10 min erhitzt. Das Produkt wurde bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert.

### 2.3.4. Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative *Real-Time Poly-chain-reaction* (PCR) ist eine Methode, die die Quantifizierung von Nukleinsäuresequenzen in einer Probe ermöglicht. Die Nukleinsäure wird von einer DNA-Polymerase amplifiziert. Aus der Zunahme der DNA während der Amplifikationsschritte lässt sich auf die ursprüngliche Anzahl der Sequenz schließen. In dieser Arbeit wurden TaqMan<sup>®</sup>-Sonden verwendet, welche den Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) nutzen. Spezifische Sonden, die an die zu untersuchende Sequenz binden, sind an zwei Farbstoffe gekoppelt, wovon der eine als *Reporter*, der andere als *Quencher* bezeichnet werden. Während der Messung wird der *Reporter* durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und sendet einen Teil der absorbierten Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge aus. Der *Quencher* absorbiert dieses Licht, solange er sich in unmittelbarer Nähe zum *Reporter* befindet. Bei der Amplifikation der Fragmente werden die Sonden von der Taq-Polymerase abgebaut und die beiden Farbstoffe trennen sich räumlich voneinander. Dadurch steigt das Signal des *Reporters*, was detektiert werden kann. Die Zunahme des Signales steigt anfangs proportional zur Konzentration der Sequenz. Der Zyklus, bei dem ein zuvor festgesetzter Schwellenwert überschritten wird, wird als Ct-Wert bezeichnet. Alle Messungen wurden am ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems) durchgeführt.

#### 2.3.4.1. Quantitative PCR der miR-155

Die Analyse erfolgte in Relation auf ein Gen, welches konstitutionell exprimiert wird, ein sogenanntes Referenzgen. Hierfür wurde RNU48 gewählt, eine ribosomale RNA. Zur Durchführung der Messung wurden je 1,33 µl des jeweiligen RT-Produktes in drei Löcher einer 96-Lochplatte pipettiert. Darauf wurden 18,67 µl eines zuvor angesetzten Master-Mixes gegeben. Die Zusammensetzung des Master-Mixes ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

**Tabelle 10: Pipettierschema des Master-Mixes für die qPCR der miRNAs**

Reagenz	Volumen [µl] / Reaktion
2-fach MasterMix (inkl. Enzym)	10,00
20 x TaqMan <sup>®</sup> miRNA Assay	1,00
Wasser RNase-frei	7,67
<b>Total</b>	<b>18,67</b>

Für jede DNA-Sequenz wurde ein eigener Master-Mix hergestellt, da die Sonden und *Primer* spezifisch für die Sequenz sind. Die Programmeinstellungen für die qPCR wurden, wie in nachfolgender Tabelle dargestellt, gewählt.

**Tabelle 11: Programmeinstellung der qPCR**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	
Aktivierung des Enzyms	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	15 sek	40 x
Synthese	60 °C	60 sek	

Denaturierung und Syntheseschritt wurden 40 Mal wiederholt. Die Auswertung der quantitativen PCR erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (siehe Kapitel 2.6.2.).

#### 2.3.4.2. Quantitative PCR von BIC und Glucuronidase

Als *Housekeeping*-Gen wurde für die Bestimmung der relativen Expression des Gens BIC die mRNA der Glucuronidase verwendet. Zur Durchführung der Messung wurden je 1,66 µl des jeweiligen RT-Produktes in drei Löcher einer 96-Lochplatte pipettiert. Darauf wurden 18,34 µl eines zuvor angesetzten Master-Mixes gegeben. Die Zusammensetzung des Master-Mixes ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

**Tabelle 12: Pipettierschema des Master-Mixes für die qPCR von BIC**

Reagenz	Volumen [µl] / Reaktion
2-fach MasterMix (inkl. Enzym)	10,00
20 x TaqMan <sup>®</sup> miRNA Assay	1,00
Wasser RNase-frei	7,34
<b>Total</b>	<b>18,34</b>

Der Master-Mix für die Glucuronidase wurde aus eigens hergestellten Primern und Sonden angesetzt. Von Vorwärts-, Rückwärtsprimer und Sonde wurde jeweils 1 µl eingesetzt, weshalb das Volumen des Wassers auf 5,34 µl reduziert wurde, um das gleiche Gesamtvolumen zu erreichen.



men zu erreichen. Die Programmeinstellungen wurden, wie in nachfolgender Tabelle dargestellt, gewählt.

**Tabelle 13: Reaktionsbedingungen der qPCR**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	
Aktivierung des Enzyms	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	15 sek	40 x
Synthese	60 °C	60 sek	

Denaturierung und Syntheseschritt wurden 40 Mal wiederholt. Die Auswertung der quantitativen PCR erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (siehe Kapitel 2.6.2.).

## 2.4. Proteinbiochemische Verfahren

### 2.4.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Mit proteinbiochemischen Verfahren sollte der Einfluss der miR-155 auf die Expression regulativer Proteine des PI3K/Akt-Signalweges untersucht werden. Transfizierte Zellen wurden zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h geerntet, abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 180 rpm) und in 50 µl RIPA-Puffer aufgenommen. Der RIPA-Puffer war zuvor mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzt worden, um einen Abbau und die Dephosphorylierung der Proteine zu verhindern. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C eingefroren.

Zur weiteren Aufarbeitung der Proteine wurden die Zellen nach dem Auftauen zunächst mittels Ultraschallpulsen (2 x 8 Pulse) vollständig lysiert. Das Lysat wurde bei 10.000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der flüssige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übertragen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde durch Versetzen der Proben mit dem Bradfordreagenz (BioRad) erreicht. Dieser Farbstoff bindet an positiv geladene Aminosäurereste der Proteine, was zu einem Farbumschlag von braun zu blau führt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm lässt auf den Proteingehalt schließen. Anhand einer zuvor

erstellten Eichkurve mit Proteinlösungen bekannter Konzentrationen konnte die Konzentration der einzelnen Proben bestimmt werden.

Von jeder Probe wurden mehrere Verdünnungen mit Aqua dest. hergestellt. Zu 800 µl der Verdünnung wurden 200 µl Bradfordreagenz gegeben und das Gemisch für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 200 µl des Gemisches in jeweils drei Vertiefungen einer 96-Lochplatte gegeben und die Absorption bei 595 nm gemessen.

Die Proben wurden anschließend mit gleichem Volumen zweifach Probenpuffer und fünf Prozent Mercaptoethanol versetzt und die Proteine bei 95 °C für 10 min denaturiert. Danach wurden die Proben erneut bei -20 °C eingefroren.

### 2.4.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese lassen sich Proteine anhand ihrer Größe in einem Gel auftrennen. Die Anwesenheit von SDS im Gel verhindert die Auftrennung der Proteine nach ihrer Ladung, sodass die Proteine allein durch ihre unterschiedliche Größe aufgetrennt werden.

In die Vertiefungen des zuvor gegossenen 15%-igen Gels wurden 25 µg der Proben übertragen und auf 40 µl mit Probenpuffer aufgefüllt. In einer Vertiefung wurde ein Größenstandard mitgeführt. Die Proteine wurden anschließend bei gleichbleibender Spannung aufgetrennt und danach mittels *Western Blot* auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen (siehe 2.4.3)

### 2.4.3. Semi Dry Western Blot

Mittels *Western Blot* wurden für die vorliegende Arbeit die zuvor in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen. Nach der Übertragung auf die Membran können die Proteine durch verschiedene Techniken sichtbar gemacht werden und optisch quantifiziert werden.

Für die Übertragung der Proteine auf die Membran wurde die *Semi-Dry*-Technik verwendet. Gel und Membran liegen bei dieser Methode zwischen mehreren Schichten Whatmann-

Filterpapier eingebettet. Ein elektrisches Feld, welches senkrecht durch die Membran gerichtet ist, wurde angelegt. Die Feldstärke entsprach 1 A/cm<sup>2</sup> Membranoberfläche.

Nach der Übertragung der Proteine erfolgte die Färbung der Proteine mit dem Farbstoff Ponceau S. Dieser Farbstoff bindet reversibel an positiv geladene Aminosäurereste der Proteine und lässt auf der Membran somit Proteinbanden rötlich erscheinen. Eine ungleichmäßige Proteinübertragung sowie Luftblaseneinschlüsse auf der Membran konnten somit ausgeschlossen werden.

Die Detektion spezifischer Proteine erfolgte nach der Inkubation der Membran in Lösungen, welchen Antikörpern beigesetzt waren. Zunächst wurde die Membran in Anode II-Puffer von Ponceau S entfärbt und danach in fünfprozentiger Magermilch in TBST für 60 min geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für 60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Die Antikörper und deren Konzentration sind der folgenden Tabelle zu entnehmen. Nach der Inkubation wurde die Membran zunächst drei Mal für jeweils 5 min in TBST gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation für 60 min mit dem Sekundärantikörper, welcher das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet.

**Tabelle 14: Verwendete Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Größe</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Wirt</b>	<b>Verdünnung sek. AK</b>
pAKT Ser 473	60 kDa	1:500 in 1% MM	Kaninchen	1:5.000
pAKT Thr 308	60 kDa	1:500 in 1% MM	Kaninchen	1:5.000
Akt	60 kDa	1:1.000 in 1% MM	Kaninchen	1:5.000
PTEN	54 kDa	1:1.000 in 1% BSA	Kaninchen	1:5.000
SHIP 1	145 kDa	1:500 in 1% MM	Kaninchen	1:5.000
GAPDH	40 kDa	1:20.000 in 1% MM	Maus	1:20.000

Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST für jeweils 5 min wurde die Membran für 5 min mit einer Substratlösung, welche Luminol und Wasserstoffperoxid enthält, versetzt. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) oxidiert das Luminol, was zu einer Chemilumineszenz führt. An einem Kodak-Imager 440 wurden die Aufnahmen angefertigt. Wurden an einer Membran mehrere Proteine bestimmt, so erfolgte zwischen den einzelnen Detektionsverfahren die Lösung der Antikörper in Stripping-Puffer.

## 2.5. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie ist eine Methode, die es erlaubt, durch Ausblenden von Streustrahlung Objekte nur in der Fokusebene zu betrachten. Es können somit Schnittbilder des Objektes erzeugt werden. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Laser-Scan-Mikroskop (LSM 410) der Firma Carl Zeiss durchgeführt. Die Anregung der Farbstoffe erfolgte dabei mit einem Diodenlaser mit der Wellenlänge 488 nm und einem Helium-Neonlaser mit der Wellenlänge 543 nm. Der Laser tastet das Objekt ab und setzt anschließend aus den Bildpunkten am Computer ein vollständiges Bild zusammen. Die Steuerung wurde mit dem Programm Carl Zeiss Lsm durchgeführt. Den Fluoreszenzdetektoren sind zwei Emissionsfilter vorgeschaltet, welche nur Licht einer bestimmten Wellenlänge passieren lassen. Diese bestanden aus einem Lang-Pass-Filter LP570 und einem Band-Pass-Filter 510-525. Das Stativ des Mikroskops war ein Axiovert 100. Als Objektiv wurde ein 63er-Ölobjektiv verwendet.

Für die vorliegende Arbeit wurde die Laser-Scanning-Mikroskopie dazu verwendet, transfizierende Oligonukleotide und siRNAs innerhalb einer Zelle nachzuweisen. Dazu wurden die Zellen zunächst mit fluorochrommarkierten Oligonukleotiden bzw. siRNAs mittels Elektroporation transfiziert. Nach einer Inkubation von 2 h wurden die Zellen geerntet und mit dem Farbstoff PKH26 GL die Zellmembran angefärbt. Dazu wurden die Zellen nach dem Ernten zwei Mal in Medium ohne Zusätze gewaschen und das Pellet in 125 µl der Lösung C gelöst. 125 µl des Farbstoffes, der zuvor in einem Verhältnis von 1:125 in der Lösung C verdünnt worden war, wurden zur Zellsuspension gegeben und für 4 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit FKS in gleicher Menge gestoppt, nach Zugabe von 500 µl Komplettmedium herunterzentrifugiert und in einem neuen 15 ml Reaktionsgefäß erneut drei Mal gewaschen. Danach wurden die Zellen in einem Objektträger mit Zellkammern aufgenommen und mikroskopiert.

## 2.6. Statistische Auswertung

### 2.6.1. Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden drei Mal durchgeführt. Aus den gemessenen Werten wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Mittels zweiseitigem t-Test wurde die Signifikanz berechnet. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Programmes Microsoft Excel 2007 durchgeführt.

Die Auswertung der Patientendaten erfolgte mit Hilfe des Programmes SPSS für Windows (Version 15). Nach Anfertigen einer Excel-Tabelle wurden die Daten in das Programm eingegeben und Box-Plot- und Kaplan-Meier-Diagramme erstellt.

### 2.6.2. Auswertung der quantitativen PCR

Die Auswertung der quantitativen PCR erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode.[88] Diese Methode erlaubt die relative Quantifizierung des jeweiligen DNA-Fragmentes in Bezug auf eine endogene Kontrolle. Als endogene Kontrolle dient dabei ein sogenanntes *Housekeeping*-Gen, welches in der betreffenden Zelle konstant ohne Einfluss von Transkriptionsfaktoren oder anderer Regulatoren exprimiert wird.

Die Ct-Werte des zu untersuchenden DNA-Fragmentes und der endogenen Kontrolle werden zunächst gemittelt. Aus beiden Werten wird darauf die Differenz gebildet. Mit der entsprechenden Differenz einer Vergleichszellpopulation wird erneut die Differenz gebildet. Nimmt man die Differenz als Exponent der Basis 2 und bildet daraus den Kehrwert, so lässt sich die Expression als Vielfaches der jeweiligen Expression in den Vergleichszellen angeben. Werte von 1 zeigen somit eine Expression wie in den Vergleichszellen an. Werte über 1 zeigen eine höhere, Werte unter 1 eine geringere Expression als in den Vergleichszellen an.[88] Die Formel lautet:

$$\text{Relative Menge des DNA-Fragmentes} = 2^{-\Delta\Delta C_t}.$$

Als Vergleichszellen wurden hämatopoetische Stammzellen untersucht, die die physiologische Zellpopulation darstellen, aus denen sich der maligne Zellklon entwickelt. Bei den Transfektionsversuchen bzw. den Untersuchungen des Multikinaseinhibitors Sorafenib wurde die Expression zu jedem Zeitpunkt auf die Expression in der Kontrolle bezogen.

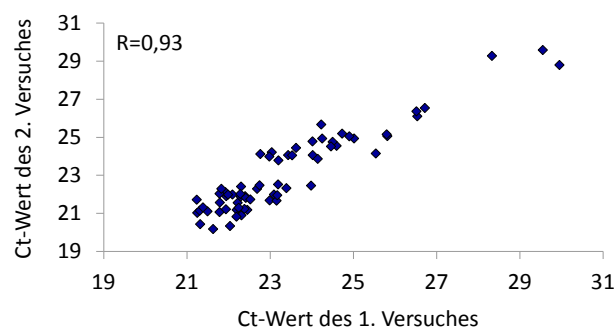
Das Programm REST<sup>®</sup> (*Relative Expression Software Tool*) nutzt die statistische Methode des „*Pair wise fixed reallocation randomisation test*“<sup>®</sup>. Diese Methode erlaubt es Daten zu vergleichen, bei denen nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann. Die Methode zeichnet sich dadurch aus, dass die Ergebnisse eine hohe Reliabilität und Reproduzierbarkeit aufweisen.[89] Außerdem kann mit Hilfe des Programmes die Effizienz der PCR für jeden *Primer* errechnet werden und die theoretische Annahme einer Verdopplung des Fragmentes zu jedem Reaktionszyklus korrigiert werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Quantitative PCR für die miR-155 und BIC

Um die Expression der miR-155 in Zelllinien und *de novo*-Zellen zu untersuchen, wurde eine quantitative *Real-Time PCR* mit Hilfe von TaqMan<sup>®</sup>-Sonden genutzt. Als endogene Kontrolle diente die *small nucleolar RNA C/DR box 48* (RNU48).

Um die Reliabilität der qPCR zu prüfen, wurde die Korrelation zweier unabhängiger Messungen miteinander verglichen. Jede Raute der folgenden Abbildung stellt das Wertepaar aus zwei unabhängigen Messungen dar. Der Korrelationskoeffizient wurde errechnet.

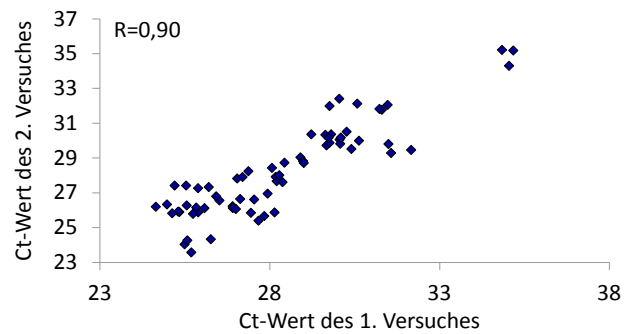


**Abbildung 5: Korrelation der Ct-Werte von zwei unabhängigen Versuchen**

Dargestellt sind die Ct-Werte zweier unabhängiger qPCR-Versuche aller verwendeter Zelllinien. Bestimmt wurde die Expression der miR-155 und der RNU48.

Der Vergleich der unabhängigen Versuche untereinander zeigt mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,93 eine hohe Korrelation.

Als endogene Kontrolle für die Bestimmung der relativen Expression von BIC diente die Glucuronidase. Analog zur Analyse der qPCR-Ergebnisse der kleinen RNAs wurden auch die Wertepaare zweier unabhängiger Versuche für BIC und die Glucuronidase verglichen. Eine Abbildung der Wertepaare wurde erstellt und die Berechnung des Korrelationskoeffizienten durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient zeugt mit einem Wert von 0,9 ebenfalls von einer hohen Korrelation zwischen zwei unabhängigen Versuchen.



**Abbildung 6: Korrelation der Ct-Werte von zwei unabhängigen Versuchen**

Dargestellt sind die Ct-Werte von zwei unabhängigen qPCR-Versuchen aller Zelllinien. Bestimmt wurde die Expression des Gens *BIC* und des Gens *Glucuronidase* als endogene Kontrolle.

### 3.2. Anreicherung der hämatopoetischen Stammzellen

Die Expression von miR-155 und *BIC* wurde mit der Expression in gesunden HSZ verglichen. Dazu wurden HSZ aus dem Knochenmark von Patienten, welche keine Stammzellerkrankung aufwiesen, angereichert. Die Stammzellen wurden somit als gesunde Stammzellen angesehen. Aus sechs verschiedenen Knochenmarkproben erfolgte die Isolierung. Die RNA aus jeweils drei Proben wurde zu gleichen Teilen vermischt und die Expression aus dem *Pool* bestimmt. Die Daten der einzelnen Proben vor und nach dem Anreicherungsprozess sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

**Tabelle 15: Anreicherung hämatopoetischer Stammzellen**

<i>Probe</i>	<b>Zellzahl (vM)</b>	<b>Zellzahl (nM)</b>	<b>CD34+/CD45+ (vM) [%]</b>	<b>CD34+/CD45+ (nM) [%]</b>	<b>Pool</b>
KM02	$1,56 \times 10^7$	$2,38 \times 10^5$	2,26	78,85	II
KM04	$9,45 \times 10^7$	$5,80 \times 10^5$	3,11	70,06	II
KM05	$9,55 \times 10^6$	$4,65 \times 10^5$	6,39	76,92	II
KM06	$5,30 \times 10^7$	$6,40 \times 10^5$	7,41	92,59	I
KM07	$2,80 \times 10^7$	$7,40 \times 10^5$	6,89	90,66	I
KM08	$5,90 \times 10^7$	$1,10 \times 10^6$	4,33	96,72	I
<b>Mittelwert</b>				<b>84,30</b>	

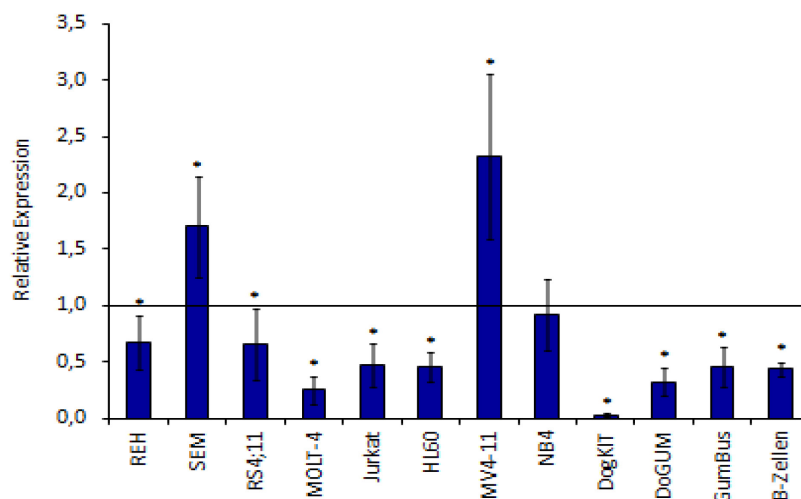
*vM*: vor der Anreicherung mittels AutoMACS, *nM*: nach der Anreicherung

Insgesamt wurde eine mittlere Reinheit von 84 Prozent erreicht. Der *Pool II* wurde zur Bestimmung der Expression von BIC verwendet, der *Pool I* zur Bestimmung der Expression der miR-155.

### 3.3. Expression der miR-155 und seines Vorläufers BIC

Einige Veröffentlichungen der vergangenen Jahre konnten zeigen, dass hämatopoetische Zellen verschiedener Differenzierungsstufen Unterschiede in der miR-155-Expression aufwiesen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch in verschiedenen Leukämien die Expression der miR-155 differenziell erfolgt. Verschiedene Leukämiezelllinien mit unterschiedlichen zytogenetischen Aberrationen und Ausreifungsstufen sollten auf die Expression der miR-155 und seines primären Transkriptes untersucht werden.

Die Expression der miR-155 wurde in elf verschiedenen Zelllinien, hämatopoetischen Stammzellen und reifen B-Lymphozyten untersucht. Dazu zählten drei AML-, drei B-ALL- und zwei T-ALL-Zelllinien sowie drei hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (hgNHL). Es erfolgten drei unabhängige Versuche. Bei jedem Versuch wurde die qPCR in Triplets ausgeführt.



**Abbildung 7: Relative Expression der miR-155 in akuten Leukämien und gesunden Zellen**

Die Abbildung stellt die relative Expression der miR-155 in verschiedenen Zelllinien und gesunden B-Lymphozyten im Bezug auf die Expression in hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) dar. Ein Wert > 1 bedeutet eine höhere Expression der miR-155, ein Wert < 1 bedeutet eine geringere Expression. Signifikante Unterschiede mit einem p-Wert von < 0,05 sind mit einem Stern markiert.



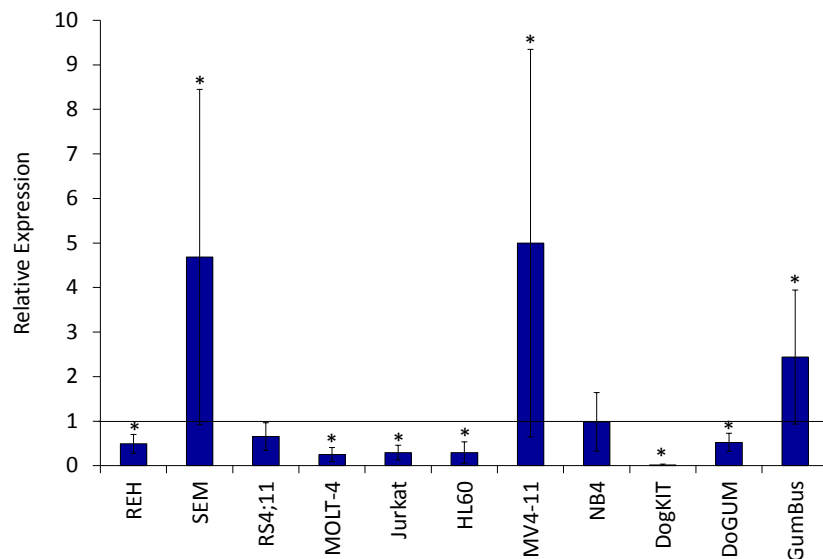
Die Abbildung zeigt die relative Expression der miR-155 bezogen auf die Expression der miR-155 in hämatopoietischen Stammzellen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Ein  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen und mit einem Stern gekennzeichnet.

In allen untersuchten Zelllinien und B-Lymphozyten konnte die miR-155 nachgewiesen werden. Gesunde B-Lymphozyten zeigen im Vergleich zu hämatopoetischen Stammzellen eine signifikant verminderte Expression. Zwei Zelllinien zeigten eine signifikant höhere Expression: die B-ALL-Zelllinie SEM erreichte das 1,7-Fache des Wertes der HSZ und die AML-Zelllinie MV4-11 erreichte gar das 2,3-Fache. Alle anderen ALL- und AML-Zelllinien zeigten im Vergleich eine verminderte Expression. Die beiden T-ALL-Zelllinien MOLT-4 und Jurkat erreichten nur Werte zwischen rund einem Viertel und der Hälfte der Expression, die in HSZ gemessen wurde, und zeigten damit gegenüber den B-ALL-Zelllinien eine geringere Expression. Die niedrigste Expression wurde in der NHL-Zelllinie DogKIT detektiert, wogegen DoGUM und GumBus ungefähr die Werte der B-Lymphozyten erreichten. Alle NHL-Zelllinien zeigten eine signifikant niedrigere Expression als HSZ. Nur die AML-Zelllinie NB4 zeigte eine Expression, die der Expression in hämatopoetischen Stammzellen entsprach.

Die miR-155 ist das Endprodukt einer mehrere Schritte umfassenden Prozessierung eines primären Transkriptes, der sogenannten pri-microRNA-155. Die miR-155 wird aus dem Transkript des BIC-Gens (MIR155HG) prozessiert. Die Expression dieses Gens wurde ebenfalls bestimmt. Dargestellt in der folgenden Abbildung sind die errechneten Mittelwerte dreier unabhängiger qPCR-Versuche und deren Standardabweichung. Alle qPCR-Versuche wurden in Triplets durchgeführt. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet und mit einem Stern gekennzeichnet.

Auch die Expression des BIC-Gens konnte in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Die AML-Zelllinie NB4 zeigte eine zu hämatopoetischen Zellen vergleichbare Expression. Die B-ALL-Zelllinie RS4;11 zeigte eine leicht geringere Expression, die jedoch nicht signifikant war. Die Zelllinien SEM und MV4-11, welche auch eine hohe miR-155 Expression zeigten, fielen auch durch eine hohe BIC-Expression auf, die das 4,5-Fache der HSZ deutlich überstieg. Bei der NHL-Zelllinie GumBus lag eine 2,5-fach höhere Expression im Vergleich zu HSZ vor. Alle anderen Zelllinien exprimierten das Gen BIC signifikant geringer als hämatopoetische Stammzellen. Die T-ALL-Zelllinien MOLT-4 und Jurkat fielen erneut durch eine

geringere Expression im Vergleich zu den B-ALL Zelllinien auf. Die niedrigste Expression wurde mit einem Wert von rund 0,01 erneut in der NHL-Zelllinie DogKIT detektiert.

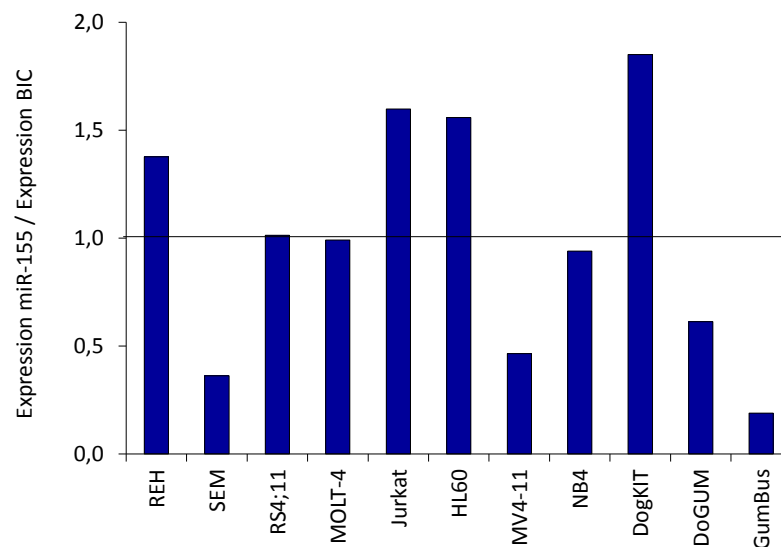


**Abbildung 8: Relative Expression der pri-miR-155 BIC in akuten Leukämien**

Die Abbildung zeigt die relative Expression des Gens BIC in akuten Leukämie-Zelllinien im Bezug auf die Expression in hämatopoetischen Stammzellen. Ein Wert  $> 1$  entspricht einer höheren Expression als in HSZ. Ein Wert  $< 1$  entspricht einer niedrigeren Expression. Unterschiede zur Expression in HSZ mit einem  $p < 0,05$  wurden als signifikant gewertet und mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Expression der miRNAs ist nicht nur abhängig von der Expression der sie kodierenden Gene, sondern wird auch durch die Regulation der Prozessierung bestimmt (siehe 1.1.1.). Ein Quotient aus der mittleren Expression der miR-155 und des Gens BIC wurde gebildet, um die Effizienz der Prozessierung der miR-155 abzuschätzen. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Quotienten für jede untersuchte Zelllinie.

Die Abbildung zeigt, dass die Zelllinien SEM, MV4-11 und GumBus eine geringe Prozessierungseffizienz besitzen. SEM und MV4-11 zeigen trotz geringer Prozessierungseffizienz eine hohe miR-155-Expressionswerte. Die Zelllinie GumBus dagegen zeigt eine verminderte miR-155-Expression im Vergleich zu HSZ. DogKIT, die durch eine sehr geringe miR-155-Expression aufgefallen war, zeigt, ähnlich wie die Zelllinien REH, Jurkat und HL60, eine sehr hohe Prozessierungseffizienz. Die Grafik zeigt, dass die unterschiedliche Prozessierung von BIC zur reifen miR-155 die Unterschiede in der Expression von BIC nivelliert. Einige Zelllinien mit sehr hoher BIC-Expression zeigen eine geringe Prozessierungseffizienz, wogegen Zelllinien mit geringer BIC-Expression eine sehr effiziente Prozessierung durchführen.



**Abbildung 9: Effizienz der miR-155-Prozessierung in akuten Leukämien**

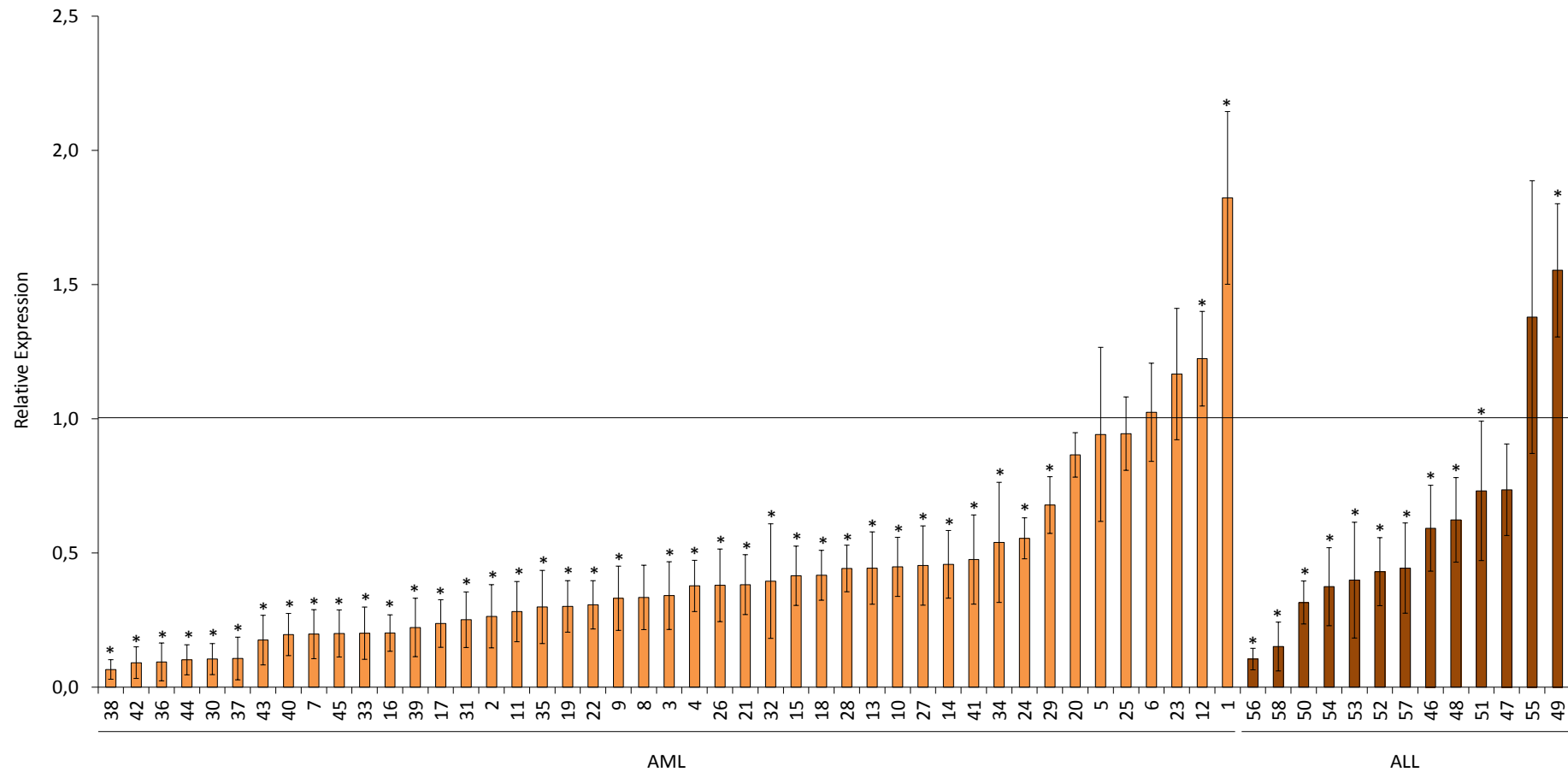
Dargestellt ist der Quotient aus der mittleren Expression der miR-155 und der mittleren Expression von BIC. Je höher der Quotient, desto effizienter wird die miR-155 aus dem Gen BIC prozessiert.

### 3.4. Expression der miR-155 in *de novo*-Leukämiezellen

Die Expression der miR-155 und von BIC wurden in *de novo*-Zellen von Patienten mit akuten Leukämien bestimmt und mit klinischen Daten verglichen. Die leukämischen Blasten wurden aus dem Knochenmark bzw. dem Blut mittels Dichtezentrifugation (siehe 2.2.2.) isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Nur Proben mit einem Blastenanteil von über 60 Prozent wurden in die Analyse einbezogen.

Insgesamt wurden Proben von 45 Patienten mit AML und von 13 Patienten mit ALL untersucht. Das mittlere Erkrankungsalter bei Diagnose der AML lag bei 63 Jahren, bei der Diagnose der ALL bei 50 Jahren. Eine Polychemotherapie mit kurativer Zielsetzung erhielten 31 der Patienten mit AML und zwölf der Patienten mit ALL. Zusätzlich erhielten 13 Patienten mit AML eine allogene Stammzelltransplantation sowie vier der Patienten mit ALL. Von allen Patienten mit einer AML waren vier Proben eines Rezidivs. Unter den ALL-Patienten gab es ein Rezidiv. Eine Tabelle mit den Expressionswerten und den klinischen Daten der einzelnen Proben befindet sich im Anhang. Durch morphologische und zytochemische Untersuchungen wurde die AML entsprechend der FAB-Klassifikation aufgeteilt. Unter den AML-Patienten konnten drei Proben einer M0, sieben einer M1, vier einer M2, zwei einer M3, acht

Proben einer M4, sechs einer M5 sowie drei einer M7 zugeteilt werden. Zwölf Proben konnten nicht klassifiziert werden. Unter den ALL-Proben befanden sich zwei pro-B-ALL, sechs common-B-ALL, eine prä-B-ALL, eine pro-T-ALL, eine prä-T-ALL, eine kortikale T-ALL und eine reife T-ALL. Bei 28 der Patienten mit AML wurden molekularbiologische Untersuchungen zur Bestimmung von Mutationen von FLT3 und NPM1 durchgeführt. Bei drei Patienten (zwölf Prozent) konnte eine ITD-Mutation der FLT3 nachgewiesen werden. Sechs aller untersuchten Proben (21 Prozent) wiesen eine Mutation von NPM1 auf. Die nachfolgende Grafik zeigt die Expression der miR-155 in den untersuchten Proben als Vielfaches der Expression der miR-155 in HSZ.



**Abbildung 10: Expression der miR-155 in de novo-Zellen**

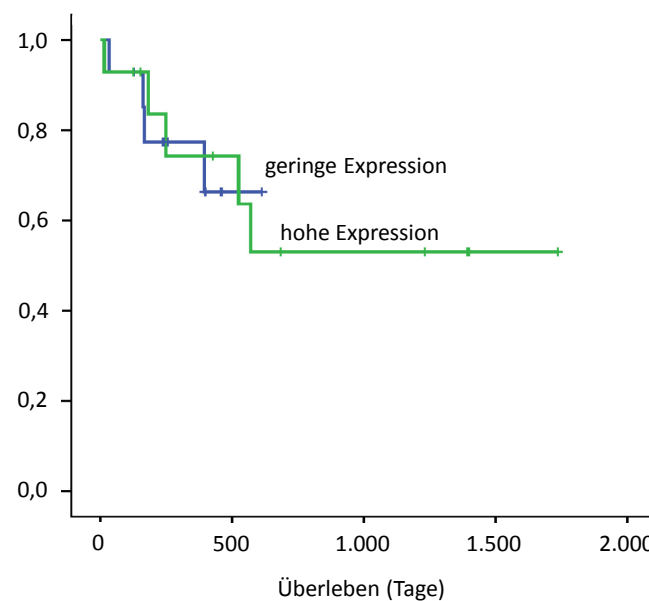
Dargestellt ist die Expression der miR-155 in de novo-Leukämiezellen mit Standardabweichung im Vergleich zur Expression in HSZ. Ein Wert  $> 1$  entspricht einer höheren Expression, ein Wert  $< 1$  entspricht einer geringeren Expression als in HSZ.

Die miR-155 wurde in allen untersuchten AML- und ALL-Proben nachgewiesen. Verglichen mit der Expression der miR-155 in HSZ zeigte eine Mehrzahl von 41 Patienten mit AML (91 Prozent) eine verminderte Expression, wovon 37 gar eine signifikant niedrigere Expression aufwiesen. Nur vier Proben (neun Prozent) zeigten eine höhere Expression als in HSZ und nur zwei von diesen Werten waren signifikant erhöht. Die Probe 1 zeigte von allen Proben die höchste Expression und hob sich deutlich von den anderen Proben ab. Diese Probe stammte von einem Patienten mit einem Rezidiv einer nicht weiter klassifizierbaren AML. Besondere zytogenetische Auffälligkeit war lediglich ein dizentrisches Chromosom aus den Chromosomen 1 und 22. Mögliche Mutationen im FLT3- und NPM1-Gen wurden nicht untersucht. Bei den Proben 23 und 12 konnte jedoch eine Mutation im FLT3-Gen nachgewiesen werden. Die Probe 12 wies außerdem noch eine Trisomie 8 auf.

Auch unter den ALL-Proben lag die Expression der meisten Proben unterhalb derer in HSZ. Zehn der elf Proben mit niedrigerer Expression zeigten eine signifikant geringere Expression. Nur zwei der Proben (15 Prozent) zeigten eine höhere miR-155-Expression als in HSZ, wobei nur die Probe 49 einen signifikanten Unterschied zeigte. Bei dieser Probe handelte es sich um eine pro-B-ALL. Zytogenetisch zeigte sich eine Translokation  $t(4;11)(q21;q23)$ , die mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Die Probe 55 zeigte einen komplex aberranten Karyotyp (siehe Anhang).

#### *3.4.1. Prognostische Bedeutung der miR-155*

Um eine mögliche prognostische Bedeutung der miR-155 in AML zu untersuchen, wurde eine Überlebensanalyse von AML-Patienten durchgeführt. Aus der Analyse wurden zunächst alle Patienten, welche ein Rezidiv erlitten hatten, ausgeschlossen. Außerdem wurden nur Patienten mit einer potenziell kurativen Therapie (Polychemotherapie mit oder ohne Stammzelltransplantation) berücksichtigt. Die Patienten wurden daraufhin in zwei Gruppen unterteilt: die Patienten mit geringerer Expression wurden jenen mit höherer Expression gegenübergestellt. Als Diskriminator wurde der Median verwendet. Die Analyse wurde mittels SPSS durchgeführt. Nachfolgende Grafik stellt die Überlebenskurven der beiden Patientengruppen dar.



**Abbildung 11: Überlebensdiagramm der AML-Patienten**

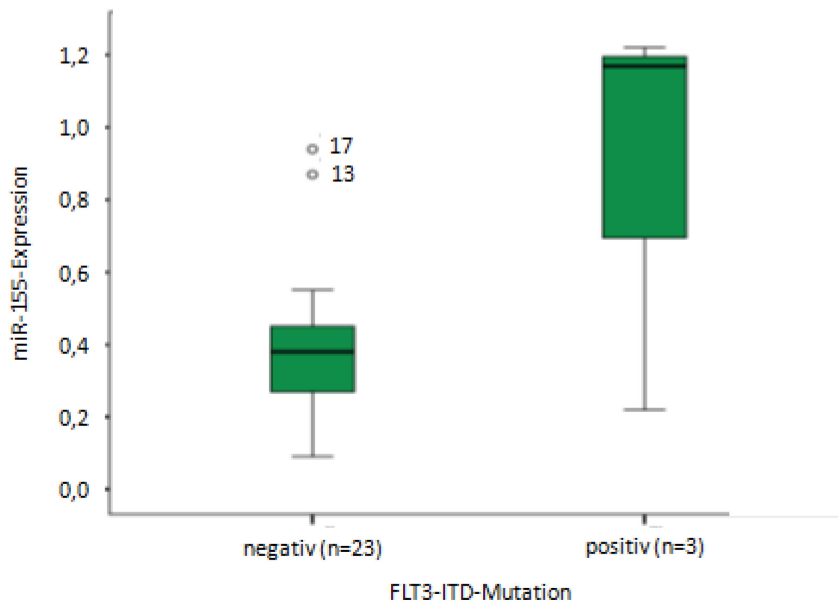
Dargestellt ist das kumulative Überleben der zwei Patientengruppen. Blau: miR-155-Expression geringer als Median, grün: miR-155-Expression höher als Median aller Proben.

Die Grafik zeigt mit einem p-Wert von 0,998 keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen. Um die Patientengruppen weiter zu homogenisieren, wurden die Patienten nach Grimwade und Hills nach zytogenetischen Gesichtspunkten in drei prognostische Gruppen unterteilt. Auch nach Ausschluss aller Patienten mit günstiger oder ungünstiger Prognose konnten keine Unterschiede im Überleben zwischen den beiden Patientengruppen festgestellt werden (Daten nicht dargestellt). Wegen der eingeschränkten Anzahl an Patienten mit ALL und der Inhomogenität dieser wurde eine Analyse nicht durchgeführt.

### 3.4.2. Zusammenhang der miR-155-Expression mit prognostischen Faktoren

Es konnte gezeigt werden, dass die miR-155-Expression von verschiedenen Faktoren abhängig ist. Garzon et al. konnten zeigen, dass Leukämiezellen mit einer FLT3-ITD-Mutation eine höhere miR-155-Expression aufweisen als Zellen, die den Wildtyp des FLT3-Gens exprimieren.[90] Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurden die Proben in zwei Gruppen aufgeteilt und untereinander verglichen. Drei Proben (zwölf Prozent) unter allen Proben, bei denen der FLT3-Status bestimmt wurde, wiesen eine ITD-Mutation des Gens auf. Das

nachfolgende *Box-Plot*-Diagramm zeigt die Expression der miR-155 in Abhängigkeit vom Mutationsstatus.

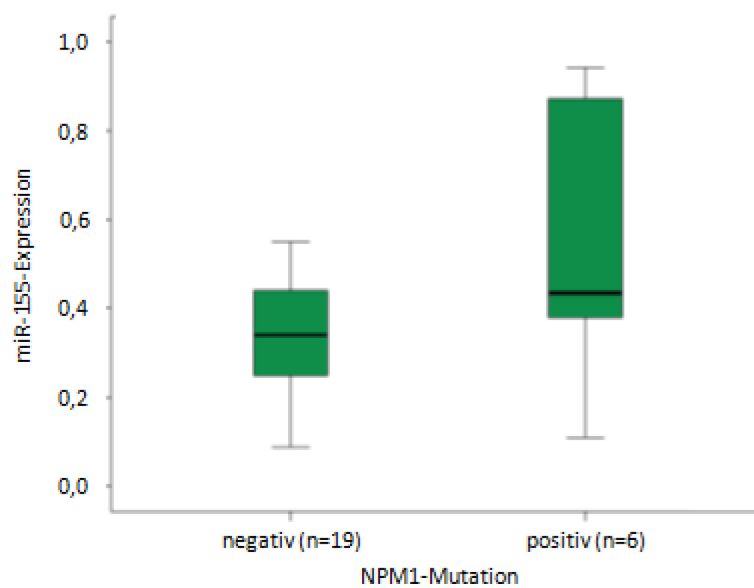


**Abbildung 12: Einfluss der FLT3-ITD-Mutation auf die Expression der miR-155**  
Dargestellt ist die Expression der miR-155 in Abhängigkeit von der Mutation des FLT3-Gens. Kleine Kreise stehen für milde Ausreißer.

Die Darstellung zeigt, dass Leukämiezellen, welche eine ITD-Mutation der FLT3 aufweisen, eine höhere miR-155-Expression zeigen. Der Unterschied ist jedoch aufgrund der geringen Fallzahl nicht signifikant. Die Proben 13 und 17, welche weder eine Mutation im FLT3-Gen noch zytogenetische Auffälligkeiten oder eine Mutation des NPM1-Gens aufwiesen, zeigten ebenfalls eine starke miR-155-Expression. Sie sind als Ausreißer dargestellt, da sie sich außerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstandes befinden.

Auch die Mutation des NPM1-Gens ist ein prognostischer Faktor. Diese Mutation ist jedoch bei Abwesenheit einer FLT3-Mutation mit einer günstigeren Prognose assoziiert. Es konnte in der oben zitierten Publikation gezeigt werden, dass auch in Proben, die eine Mutation im NPM1-Gen aufwiesen, eine höhere miR-155-Expression detektiert werden konnte. Dieser Zusammenhang wurde auch an den vorliegenden Proben geprüft. Nachfolgend ist die Expression in Abhängigkeit einer Mutation des NPM1-Gens dargestellt. Proben, die eine Mutation des FLT3-Gens aufwiesen wurden bei der Analyse nicht mit eingeschlossen.





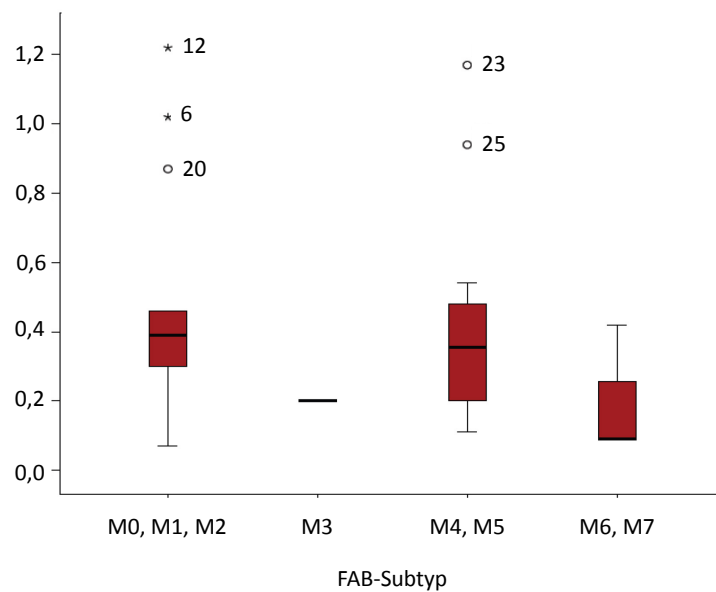
**Abbildung 13: Einfluss der NPM1-Mutation auf die Expression der miR-155**

Dargestellt ist die Expression der miR-155 in Abhängigkeit von der Mutation des NPM1-Gens.

Es zeigte sich ein leichter Trend zu höheren Expressionswerten der miR-155 bei Mutation des Gens NPM1. Dieser Trend ist jedoch bei einem p-Wert von 0,21 nicht signifikant.

### 3.4.3. Zusammenhang der miR-155-Expression mit dem FAB-Subtyp

Eine weitere Analyse sollte zeigen, ob zwischen den verschiedenen Subtypen der FAB-Klassifikation signifikante Unterschiede im Expressionsprofil der miR-155 bestehen. Die Proben, welche einem FAB-Subtyp zugeordnet werden konnten, wurden in verschiedene Gruppen unterteilt. Anschließend wurde die Expression der miR-155 zwischen den einzelnen Gruppen verglichen. Die folgende Grafik stellt die Unterschiede in der Expression der miR-155 dar.



**Abbildung 14: Expression der miR-155 in FAB-Subtypen**

Dargestellt ist die Höhe der Expression in den Leukämiezellen nach Aufteilung in FAB-Subtypen. Kleine Kreise stehen für milde Ausreißer, Sterne für extreme Ausreißer.

Die Darstellung zeigt, dass es zwischen den einzelnen Gruppen der FAB-Subtypen Unterschiede in der Expression der miR-155 gab. Während die wenig differenzierten Subtypen M0, M1 und M2 und die Subtypen M4 und M5 eine relativ hohe Expression aufwiesen, zeigten Zellen der akuten Promyelozytenleukämie (M3) signifikant geringere Werte. Auch die Zellen des Subtyps M7 zeigten eine geringere Expression. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die mit Kreisen und Sternen dargestellten Ausreißer in der Gruppe M0, M1, M2 und der Gruppe M4, M5 weisen außer der Probe 6 molekulare Marker auf, welche mit erhöhter Expression assoziiert sind (FLT3- bzw. NPM1-Mutation). Die Probe 20 weist außerdem eine Trisomie 21 auf. Die Probe 6 zeigt außer einer Trisomie 13 keine zytogenetischen Auffälligkeiten. Es wurde auch untersucht, ob Unterschiede zwischen primären Leukämien und aus einem MDS hervorgegangenen Leukämien bestehen. Signifikante Unterschiede wurden zwischen diesen beiden Gruppen nicht nachgewiesen (Daten nicht dargestellt).

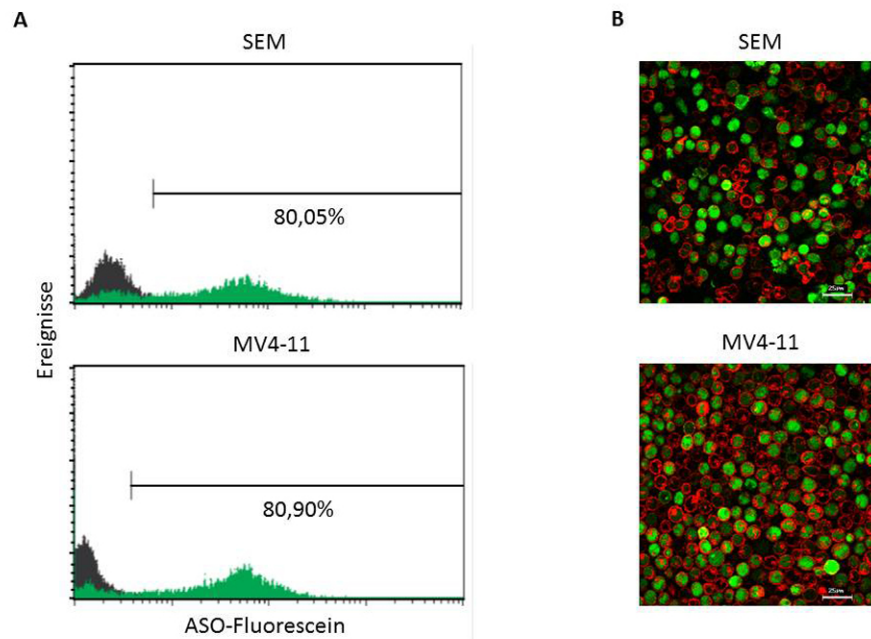
### 3.5. Hemmung der miR-155 in Zellen der akuten Leukämie

Um die funktionelle Bedeutung der miR-155 zu untersuchen, wurden Transfektionsversuche durchgeführt, die durch einen Inhibitor zu einer Suppression der miR-155 führen sollten. Es wurde ein möglicher Einfluss der miR-155 auf Zellwachstum, metabolische Aktivität und Apoptose- und Nekroseverhalten der Zelllinien angenommen. Die im Folgenden dargestellten Versuche sollten dazu dienen, einen möglichen Zusammenhang zu untersuchen.

#### *3.5.1. Bestimmung der Transfektionseffizienz*

Um eine sichere Hemmung der miR-155 zu erreichen, wurde zunächst die Transfektionsrate der zu untersuchenden Zelllinien bestimmt. Mittels durchfluss-zytometrischer Messungen wurde die Transfektionsrate ermittelt. Die Lasermikroskopie wurde dazu verwendet, die transfizierten Oligonukleotide im Zytoplasma nachzuweisen.

In beiden Zelllinien wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine Transfektionsrate von über 80 Prozent ermittelt. Die lasermikroskopischen Aufnahmen zeigen eine ähnlich hohe Transfektionsrate. Die grün fluoreszierenden Oligonukleotide kommen innerhalb der mit rot fluoreszierendem Farbstoff angefärbten Zellmembran zur Darstellung. Somit konnte gezeigt werden, dass die Oligonukleotide das Zytoplasma erreichen.



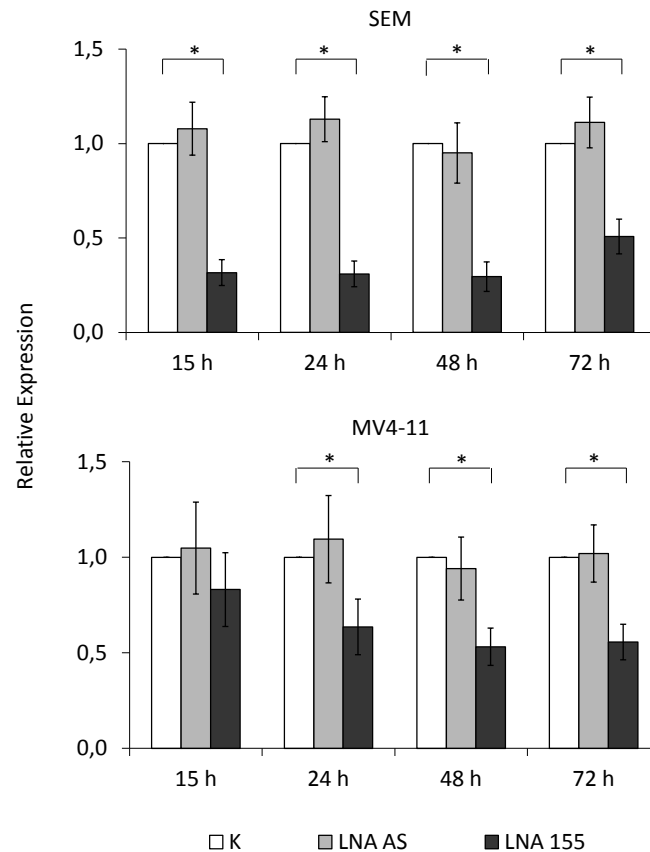
**Abbildung 15: Transfektionseffizienz der Zelllinien SEM und MV4-11**

Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse eines Transfektionsexperimentes.

**A:** Durchflusszytometrie: Die schwarze Kurve stellt die Eigenfluoreszenz der Zellen dar. Die grüne Kurve stellt die Fluoreszenz der mit einem fluoreszierenden Oligonukleotid transfizierten Zellen dar. **B:** Konfokale Lasermikroskopie: Die Zellmembran wurde mit PKH26 gefärbt (rot). Transfizierte Zellen sind grün angefärbt.

### 3.5.2. Einfluss der Inhibition auf die Expression der miR-155

Die Expression der miR-155 wurde im Verlauf der Transfektionsversuche mittels qPCR untersucht. In der folgenden Abbildung sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen sowie die jeweilige Standardabweichung dargestellt. Die Ct-Werte der qPCR wurden mit der REST-Methode analysiert. P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant gewertet.



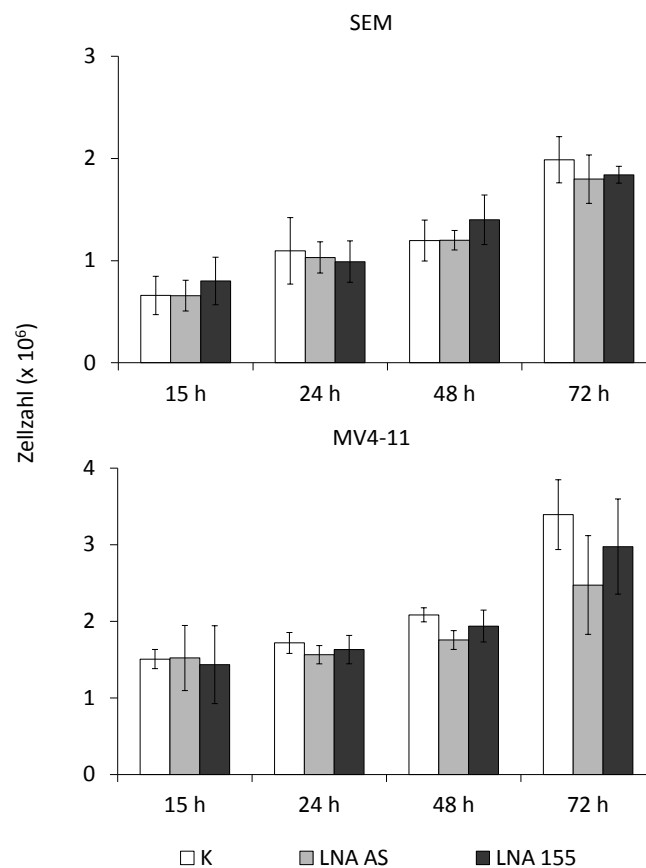
#### **Abbildung 16: Inhibition der Expression der miR-155**

Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei unabhängigen Versuchen und die jeweilige Standardabweichung. Als Kontrolle wurden zu jedem Zeitpunkt die mit Wasser transfizierten Zellen verwendet. K: Kontrolle, LNA AS: unspezifisches LNA Oligonukleotid, LNA 155: miR-155 spezifisches Oligonukleotid.

Die Zellen, welche mit einem spezifischen Oligonukleotid gegen die miR-155 transfiziert wurden, zeigten im Vergleich zu den Kontrollzellen eine signifikante Reduktion der miR-155-Expression. Bereits nach 15 h nach der Transfektion war in der Zelllinie SEM eine signifikante Hemmung der miR-155 nachweisbar. Die Expression der miR-155 stieg erst nach 72 h wieder an. Die Zellen, welche mit einem unspezifischen Oligonukleotid transfiziert wurden, zeigten zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied in der miR-155-Expression zu den Kontrollzellen. Bei den MV4-11 Zellen wurde eine signifikante Inhibition der miR-155 erst 24 h nach der Transfektion nachgewiesen. Eine maximale Hemmung im Vergleich zu der Kontrolle wurde nach 48 h erreicht, wobei die miR-155-Expression jedoch nur auf 50 Prozent reduziert war. Die Zellen, welche mit einem unspezifischen Oligonukleotid transfiziert wurde, zeigten keine signifikanten Unterschiede in der miR-155-Expression zu den Kontrollzellen.

### 3.5.3. Zellproliferation nach Inhibition der miR-155

Kong et al. konnten zeigen, dass in Mammakarzinom-Zelllinien eine Hemmung der miR-155 zu einer Reduktion der Proliferation führte.[91] Ob dieser Zusammenhang auch in Leukämiezelllinien beobachtet werden kann, sollte in den Transfektionsversuchen geprüft werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Hemmung der miR-155 das Proliferationsverhalten der Zellen beeinflusst. Die Hypothese wurde durch die Auszählung der Zellen zu bestimmten Zeiten überprüft. Zellen, welche nicht mit dem spezifischen Inhibitor transfiziert wurden, dienten als Kontrolle.



**Abbildung 17: Einfluss der Hemmung der miR-155 auf die Proliferation der Zelllinien**  
 Dargestellt sind die zu jedem Zeitpunkt gezählten Zellen als Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen mit der jeweiligen Standardabweichung. K: Kontrolle, LNA AS: unspezifisches Oligonukleotid, LNA 155: miR-155 spezifisches Oligonukleotid.

Um den Einfluss der Hemmung der miR-155 auf die Proliferation zu untersuchen, wurden die viablen Zellen nach 15 h, 24 h, 48 h und 72 h mittels Neubauerzählkammer gezählt. In den Abbildungen sind jeweils die Mittelwerte mit den errechneten Standardabweichungen zu jedem Zeitpunkt dargestellt. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem t-Test ermittelt.

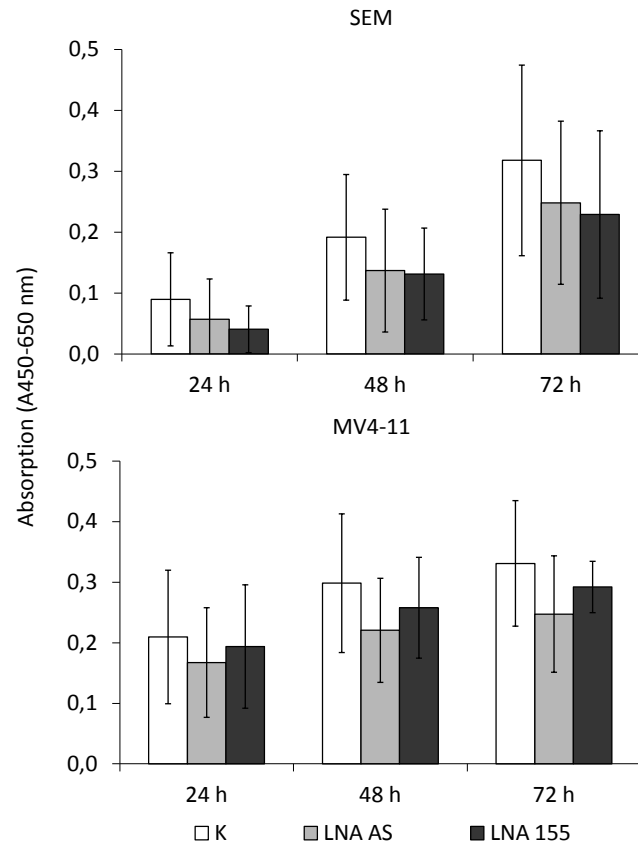
Die Zellzahl nahm über den beobachteten Zeitpunkt in beiden Zelllinien zu. Innerhalb des beobachteten Zeitraumes von 72 h nach Transfektion kommt es in beiden Zelllinien zu einer Verdopplung der ursprünglichen Zellzahl. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle bestanden nicht. In der Zelllinie MV4-11 proliferierten die Kontrollzellen etwas schneller als die anderen Ansätze. Die Zellen, welche mit dem unspezifischen Oligonukleotid transfiziert wurden, proliferierten am langsamsten. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

#### *3.5.4. Metabolische Aktivität nach Transfektion eines miR-155-Inhibitors*

Neben dem Einfluss auf die Poliferation wurde auch ein Einfluss der miR-155 auf die metabolische Aktivität der Zellen angenommen. Die Inhibitionsversuche sollten einen möglichen Zusammenhang aufdecken.

Mittels WST-1-Test lassen sich Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Zellen ziehen. Die folgenden Grafiken zeigen die Ergebnisse dreier unabhängiger Transfektionsversuche. Die Umsetzung des Farbstoffes WST-1 wurde zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion bestimmt. In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Die Grafiken zeigen bei beiden Zelllinien eine Zunahme der metabolischen Aktivität in dem untersuchten Zeitraum. In beiden Zelllinien wiesen Kontrollzellen, welche nur mit Wasser elektroporiert wurden, die höchste metabolische Aktivität auf. In der Zelllinie SEM zeigten die Zellen, welche mit dem miR-155 spezifischen Oligonukleotid transfiziert worden waren, die geringste metabolische Aktivität. In der Zelllinie MV4-11 war in den Zellen, welche mit dem unspezifischen Oligonukleotid transfiziert worden waren, die geringste metabolische Aktivität zu vermerken. All diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 18: Einfluss der miR-155-Inhibition auf die metabolische Aktivität**

Dargestellt sind die Absorptionswerte (650–450 nm) als Mittelwert mit der errechneten Standardabweichung zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h. K: Kontrolle, LNA AS: unspezifisches Oligonukleotid, LNA 155: miR-155-spezifisches Oligonukleotid. n=3.

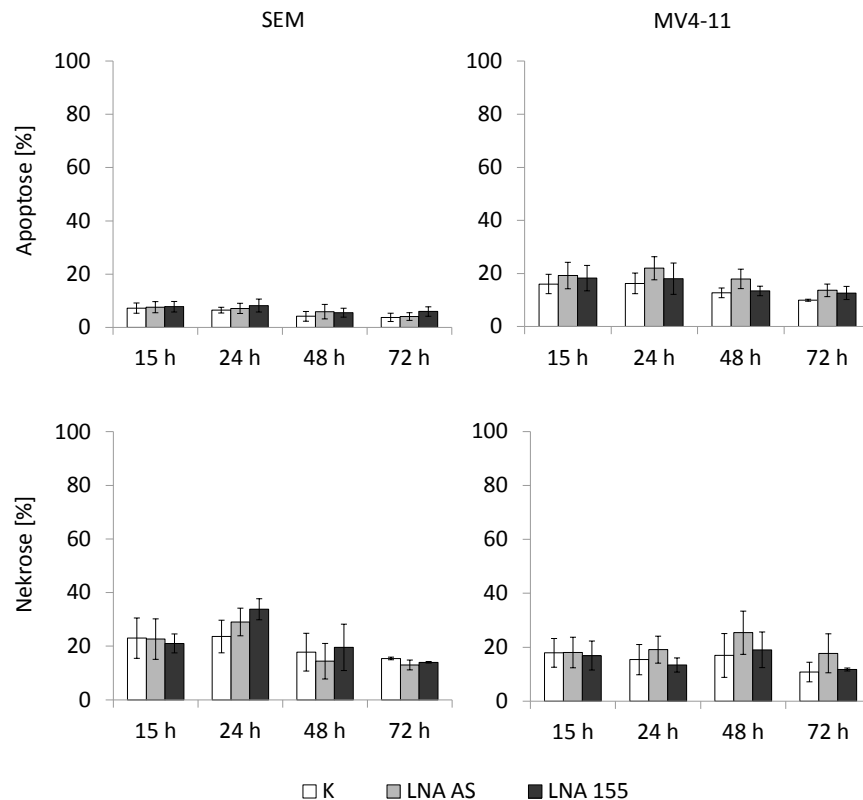
**3.5.5. Einfluss der miR-155-Hemmung auf Apoptose und Nekrose**

Mit Hilfe durchflusszytometrischer Methoden wurden die Zellen im Verlauf des Versuches auf die Apoptose- und Nekroserate hin untersucht. Die Bestimmung wurde zu den Zeitpunkten 15 h, 24 h, 48 h und 72 h durchgeführt. Die Abbildung zeigt die errechneten Mittelwerte sowie die Standardabweichung dreier unabhängiger Versuche.

Die Abbildungen zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen in beiden Zelllinien. In der Zelllinie SEM wurden die höchsten Apoptose- und Nekroseraten nach 24 h gemessen, welche im Verlauf wieder abfielen. Der Anteil der apoptotischen Zellen blieb ständig unter neun Prozent und fiel gegen Ende des Beobachtungszeitraumes auf ca. vier bis sechs Prozent ab. Der Anteil der nekrotischen Zellen erreichte zu Beginn Raten von etwa einem Drittel. Nach 72 h fiel der Anteil der nekrotischen Zellen auf 13 bis 15 Prozent ab. In der Zelllinie MV4-11 zeigten sich die höchsten Apoptoseraten nach 24 h. Etwa 20



Prozent der Zellen waren apoptotisch. Die höchsten Nekroseraten von 17 bis 25 Prozent konnten nach 48 h nachgewiesen werden. Gegen Ende des Versuches fielen die Werte auf unter 18 Prozent ab.



**Abbildung 19: Einfluss der Inhibition der miR-155 auf Apoptose und Nekrose**

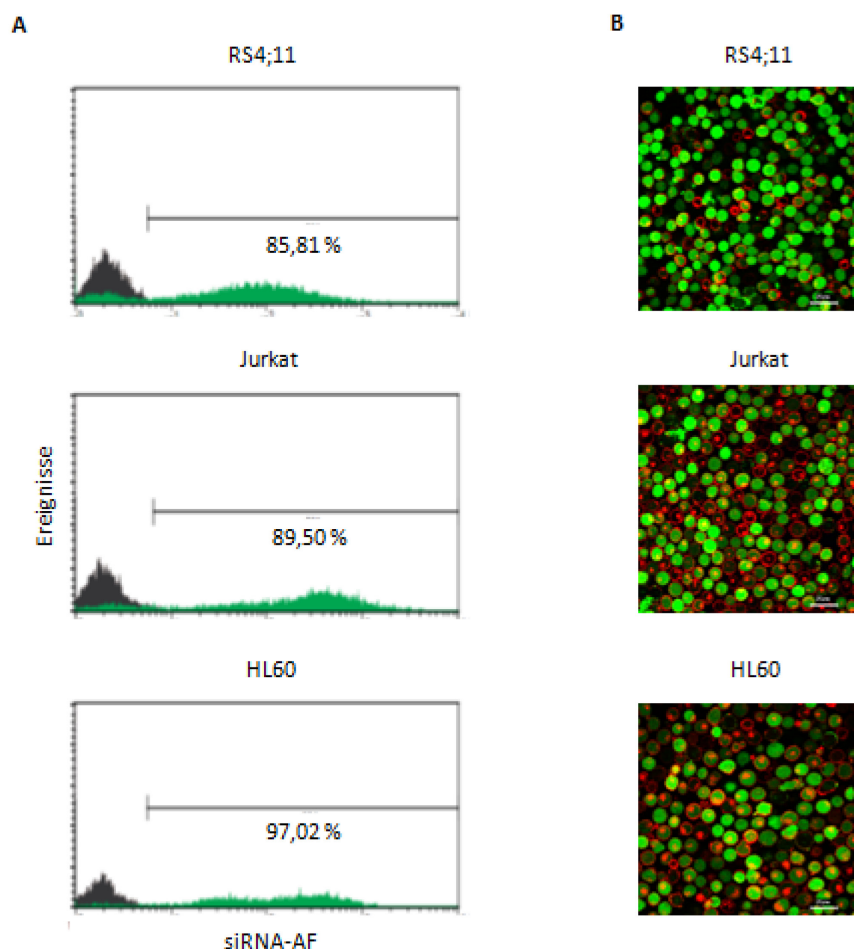
Dargestellt sind die Apoptose- und Nekroserate als Mittelwert inklusive Standardabweichung zu den Zeitpunkten 15 h, 24 h, 48 h und 72 h. K: Kontrolle, LNA AS: unspezifisches Oligonukleotid, LNA 155: miR-155 spezifisches Oligonukleotid. n=3.

### 3.6. Überexpression der miR-155 in Zellen der akuten Leukämie

Drei verschiedene Zelllinien (RS4;11, Jurkat und HL60) wurden mit einer siRNA transfiziert, deren Sequenz derer der miR-155 entspricht und deren Wirkung imitiert. Neben dem Einfluss auf Proliferation, metabolische Aktivität und Apoptose- und Nekroserate wurde auch der Einfluss auf die Expression wichtiger Proteine des PI3K/Akt-Signalweges untersucht.

### 3.6.1. Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die Transfektionsrate wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der genaue Anteil der transfizierten Zellen quantifiziert. Eine Rate über 80 Prozent sollte in allen Zelllinien erreicht werden. Mittels Lasermikroskopie wurden die an einen Farbstoff gekoppelten siRNAs innerhalb der Zelle nachgewiesen. Diese Methode sollte zeigen, dass die siRNAs das Kompartiment, in dem sie ihre Wirkung entfalten sollen, erreichen. Die nachfolgende Grafik zeigt die lasermikroskopischen Bilder der Zellen sowie die mittels Durchflusszytometrie gemessene Rate.



**Abbildung 20: Transfektionseffizienz der Zelllinien RS4;11, Jurkat und HL60**

*A: Durchflusszytometrie: Die Eigenfluoreszenz der Kontrollzellen ist schwarz, die Fluoreszenz der mit Fluorochrom markierten siRNAs transfizierten Zellen grün dargestellt. B: Fluoreszenzmikroskopie: Auf den Abbildungen sind die markierten siRNAs grün dargestellt und die Zellmembran ist rot gefärbt.*

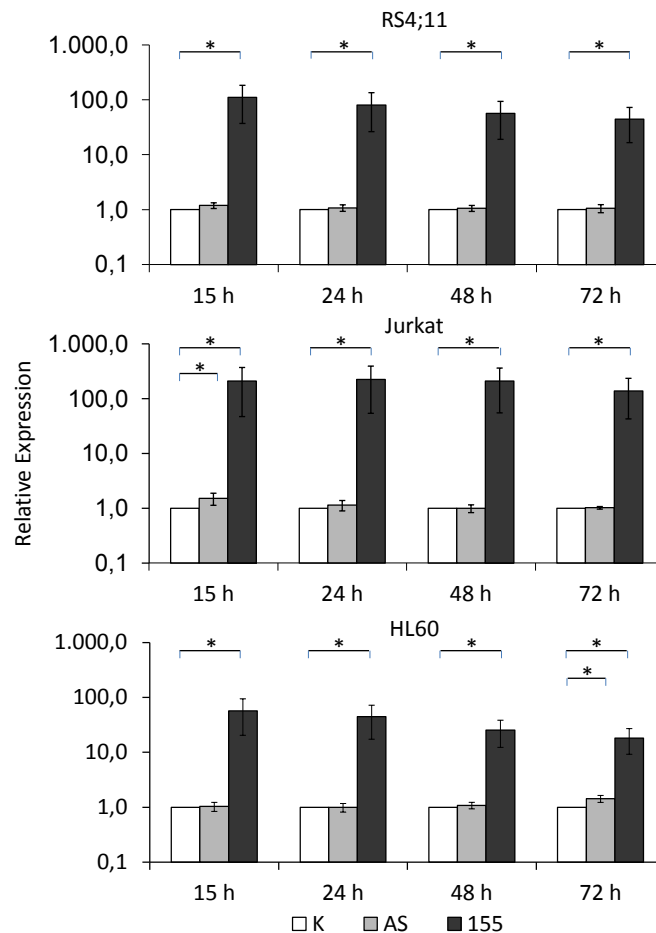
Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit einer fluoreszenzmarkierten siRNA transfiziert. Die Abbildungen zeigen, dass durch die Elektroporation in allen

Zellen eine hohe Anzahl der Zellen transfiziert werden konnte. In der Zelllinie RS4;11 betrug der Anteil der transfizierten Zellen 86 Prozent, in der Zelllinie Jurkat konnten 90 Prozent der Zellen transfiziert werden und in der Zelllinie HL60 lag deren Anteil bei 97 Prozent. Außerdem zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Bilder, dass die markierten siRNAs in allen Zelllinien das Zytosol, das Zellkompartiment, in dem sie ihre Wirkung entfalten, erreichen. Das Ziel von mindestens 80 Prozent transfizierten Zellen wurde somit in allen Zelllinien erreicht.

### *3.6.2. Einfluss der Überexpression auf die miR-155-Expression*

Die Expression der miR-155 wurde nach der Transfektion über einen Zeitraum von 72 h untersucht. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche. Die relative Expression der miR-155 bezogen auf die Expression im Kontrollansatz ist auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Signifikante Unterschiede sind durch ein Sternchen gekennzeichnet.

Die Darstellung zeigt, dass in allen mit dem spezifischen Oligonukleotid transfizierten Zellen signifikant höhere Expressionswerte der miR-155 erreicht werden konnten als in den Kontrollansätzen. Bei den Zelllinien RS4;11 und HL60 wurde der höchste Wert nach 15 h erreicht, während die höchste Expression in Jurkat-Zellen erst nach 24 h erreicht wurde. In RS4;11-Zellen konnte die Expression auf das 110-Fache gesteigert werden. Die Zelllinie Jurkat zeigte eine auf das 220-Fache gesteigerte Expression der miR-155 verglichen mit den Kontrollzellen nach 24 h. Zum Zeitpunkt 15 h zeigte sich eine Steigerung auf das 1,5-Fache in den mit dem unspezifischen Oligonukleotid transfizierten Zellen. In HL60-Zellen erreichte die Expression ein Maximum nach 15 h. In dieser Zelllinie zeigte sich in den mit dem unspezifischen Oligonukleotid transfizierten Zellen eine signifikante Zunahme im Vergleich zur Kontrolle. In den mit dem spezifischen Oligonukleotid transfizierten Zellen wurde eine Steigerung um das 57-Fache nachgewiesen. Die Expression fiel über den beobachteten Zeitraum in allen Zelllinien ab, zeigte jedoch über den gesamten Zeitraum signifikant erhöhte Werte.



### Abbildung 21: Überexpression der miR-155 in den untersuchten Zelllinien

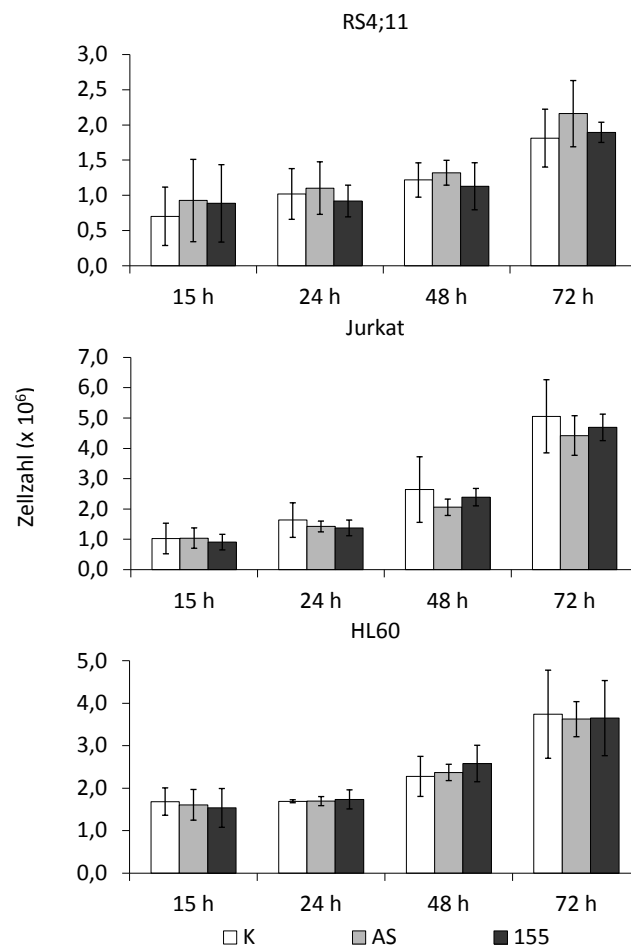
Dargestellt wurde die relative Expression und die Standardabweichung in logarithmischer Skalierung. Die transfizierten Zellen wurden nach 15 h, 24 h, 48 h und 72 h untersucht. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligonukleotid, 155: miR-155 spezifisches Oligonukleotid.  $n=3$ .

### 3.6.3. Einfluss der Überexpression der miR-155 auf die Zellproliferation

Auch nach der Transfektion der Zelllinien RS4;11, Jurkat und HL60 mit dem miR-155 Mimic wurde die Proliferation beobachtet. Die Zellzählung erfolgte jeweils zu den Zeitpunkten 15 h, 24 h, 48 h und 72 h.

In allen untersuchten Zelllinien zeigte sich eine Zunahme der Zellzahl. Die Zelllinie Jurkat proliferierte am schnellsten und erreichte im beobachteten Zeitraum eine Zunahme der Zellzahl um nahezu den Faktor fünf. Die anderen beiden Zelllinien erreichten lediglich eine Verdopplung ihrer Zellzahl im beobachteten Zeitraum. Zwischen den einzelnen Ansätzen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die mit der unspezifischen siRNA transfizierten Zellen der Zelllinie RS4;11 wiesen eine leicht erhöhte Proliferation im Vergleich zu den anderen

Ansätzen auf. In der Zelllinie Jurkat zeigten die mit dem Suspensionspuffer transfizierten Zellen die stärkste Proliferation. Keine konstanten Unterschiede waren zwischen den einzelnen Ansätzen der Zelllinie HL60 nachzuweisen.

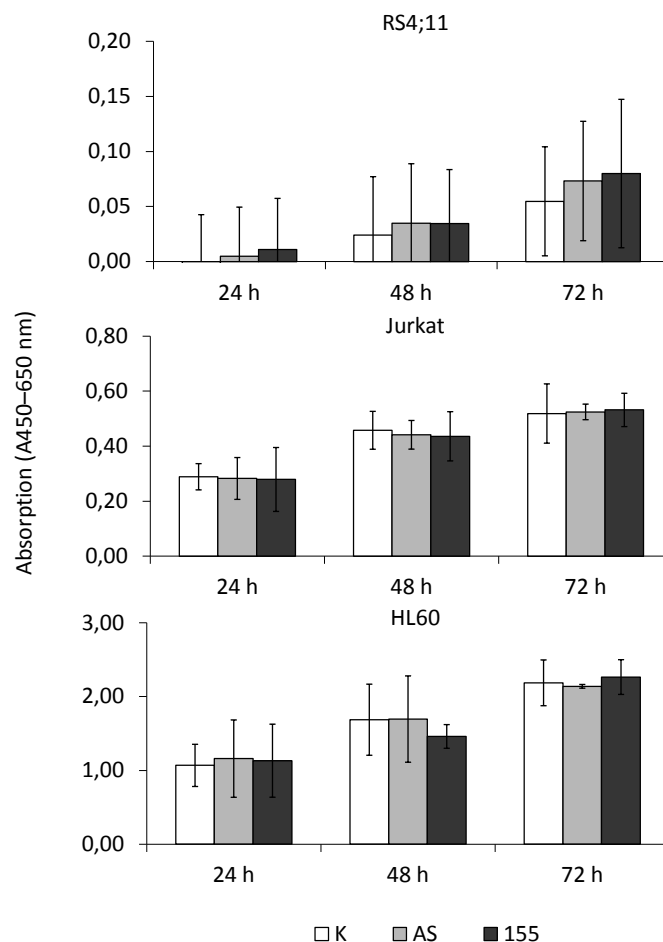


**Abbildung 22: Einfluss der Überexpression der miR-155 auf die Zellproliferation**

Dargestellt sind die Zellzahlen als Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen und die Standardabweichung. K: Kontrolle, AS: unspezifische siRNA, 155: miR-155 spezifische siRNA.

**3.6.4. Einfluss der Überexpression der miR-155 auf die metabolische Aktivität**

Mittels WST-1-Test wurde der Einfluss der miR-15 auf die metabolische Aktivität der Zellen untersucht. Der Test wurde zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche als Mittelwert mit den zugehörigen Standardabweichungen.

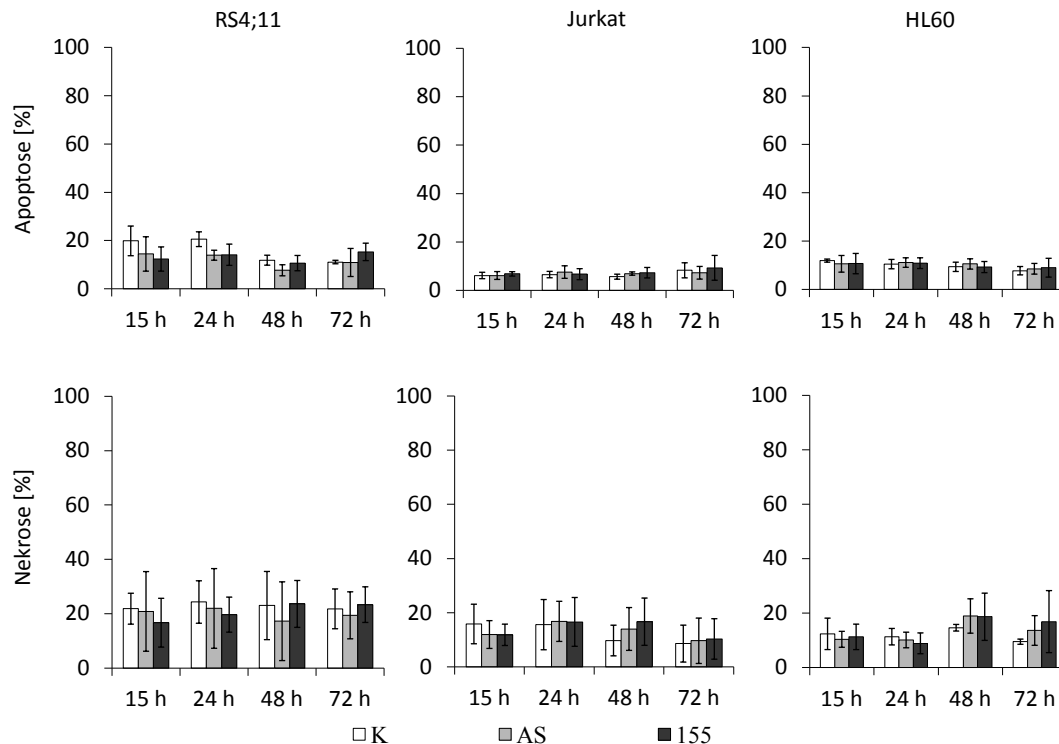


**Abbildung 23: Einfluss der Überexpression der miR-155 auf die metabolische Aktivität**  
 Dargestellt ist die Absorptionsrate der Zellsuspensionen als Mittelwert und deren Standardabweichung. K: Kontrolle, AS: unspezifische siRNA, 155: miR-155 spezifische siRNA.  $n=3$ .

In allen Zelllinien nahm die metabolische Aktivität im Verlauf des Versuches zu. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen konnten nicht festgestellt werden. In der Zelllinie RS4;11 zeigten die mit der spezifischen siRNA transfizierten Zellen eine etwas höhere metabolische Aktivität. Jedoch war kein signifikanter Unterschied zu sehen. In den anderen beiden untersuchten Zelllinien zeigte sich kein einheitliches Bild.

### 3.6.5. Apoptose- und Nekroseraten nach Transfektion eines miR-155 Mimic

Der Einfluss der Überexpression auf Apoptose und Nekrose wurde nach Transfektion mit miR-155 Mimic mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht. Die Rate der apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde zu den Zeitpunkten 15 h, 24 h, 48 h und 72 h bestimmt.



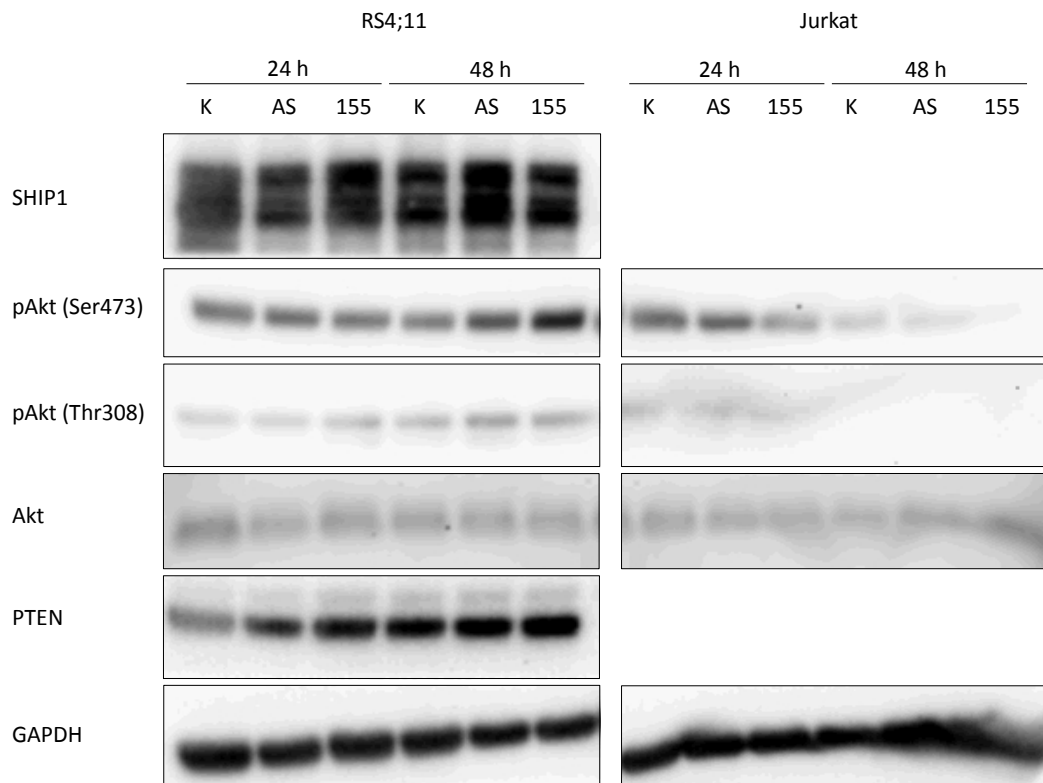
**Abbildung 24: Apoptose- und Nekroseraten nach Überexpression der miR-155**

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche inklusive der Standardabweichung der Einzelwerte der drei Zelllinien RS4;11, Jurkat und HL60. K: Kontrolle, AS: unspezifische siRNA, 155: miR-155 spezifische siRNA.

Die transfizierte Zelllinie RS4;11 zeigte die höchsten Apoptosewerte in den ersten 24 h des Versuches. Die Nekroserate blieb über den gesamten Zeitraum nahezu unverändert bei ca. 20 Prozent. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen bestanden nicht. Die Apoptoserate der Zelllinie Jurkat zeigte über den beobachteten Zeitraum einen geringen Anstieg mit einem Maximum nach 72 h. Die Nekroserate erreichte bereits nach 24 h ein Maximum von ca. 16 Prozent. Auch in dieser Zelllinie waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen zu erkennen. In HL60-Zellen fiel die Apoptoserate nach Transfektion im Verlauf des Versuches von ca. zwölf Prozent auf ungefähr acht Prozent leicht ab. Die Nekroserate zeigte ein Maximum nach 48 h und fiel daraufhin wieder ab. Die mit unspezifischer oder spezifischer siRNA transfizierten Zellen wiesen zu diesen Zeitpunkten eine etwas höhere Rate auf. Die Unterschiede waren jedoch auch hier nicht signifikant.

### 3.6.6. miR-155 beeinflusst die Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges

Mittels *Western Blot* wurde der Einfluss der miR-155 auf die Expression und die Phosphorylierung wichtiger Proteine des PI3K/Akt-Signalweges untersucht. Aus einem repräsentativen Transfektionsversuch mit den Zelllinien RS4;11 und Jurkat wurden Proteinproben zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h analysiert.



#### **Abbildung 25: Expression von Proteinen des PI3K/Akt-Signalweges**

Die Abbildung zeigt die mittels *Western Blot* analysierte Proteine. K: Kontrolle, AS: unspezifisches Oligonukleotid, 155: miR-155 spezifisches Oligonukleotid.  $n=1$

Die Abbildung zeigt die Expression des Proteins Akt und seines Phosphorylierungsstatus im Verlauf der Transfektion sowie die Expression der Negativregulatoren des PI3K/Akt-Signalweges SHIP 1 und PTEN. SHIP 1, eine Phosphatase, wurde bereits als mögliches Zielgen der miR-155 beschrieben.[92] Als Ladungskontrolle wurde die konstant exprimierte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase verwendet.

Die Zelllinie RS4;11 zeigte nach 24 h keinen Unterschied in der Expression der untersuchten Proteine. Nach 48 h zeigte sich jedoch eine Reduktion in der Expression des Proteins SHIP 1. Die an der Stelle 473 an einem Serinrest bzw. an der Stelle 308 an einem Threonin-



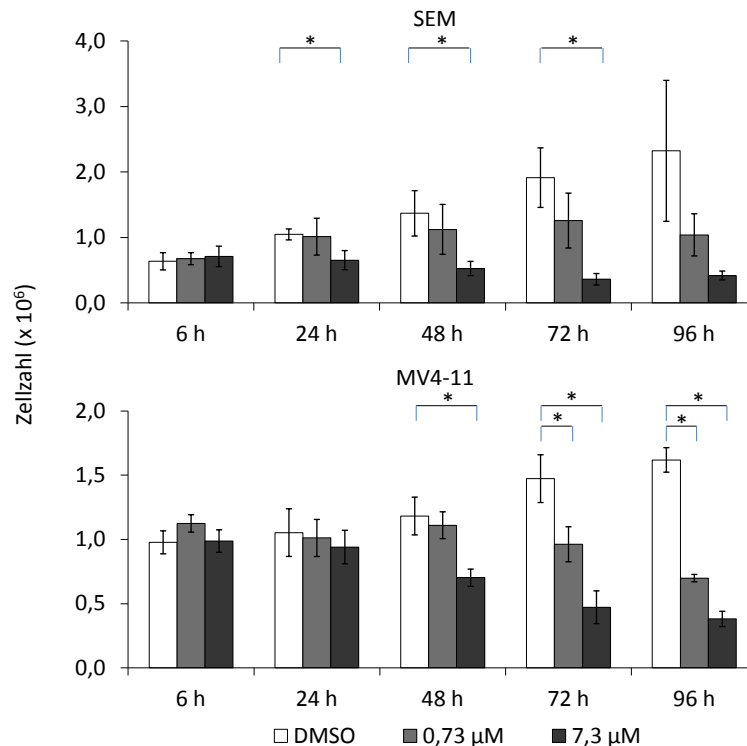
rest phosphorylierten Formen des Proteins Akt nahmen zum gleichen Zeitpunkt deutlich zu. Die gesamte Menge des Proteins Akt blieb dagegen über den gesamten Zeitraum unverändert. Die Zelllinie Jurkat zeigte eine vollständige Deletion der regulativen Proteine PTEN und SHIP 1. Auch wiesen die Zellen im Verlauf keine Unterschiede in der Expression des Proteins Akt und dessen Phosphorylierungsstatus auf.

### 3.7. Behandlung von Zellen der akuten Leukämie mit dem Kinaseinhibitor Sorafenib

Das Medikament Sorafenib (BAY 43-9006) ist ein Multikinaseinhibitor. Es hemmt die Wirkung unterschiedlicher Tyrosinkinasen, die an der Progression und der Angiogenese in vielen Krebserkrankungen beteiligt sind. Zu diesen Tyrosinkinasen gehören VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*), PDGFR (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*), c-KIT und FLT3.[93] Mutationen des Gens FLT3 sind häufig mit einer hohen Expression der miR-155 assoziiert.[90] Die Zelllinie MV4-11 weist eine FLT3-ITD-Mutation auf und exprimiert die miR-155 signifikant stärker als HSZ. Diese und die Zelllinie SEM, die auch eine hohe miR-155-Expression aufweist, wurden mit Sorafenib behandelt und dessen Einfluss auf Zellproliferation, Apoptose und Nekrose, metabolische Aktivität und die miR-155 untersucht. Die Versuche wurden über einen Zeitraum von insgesamt 96 h durchgeführt.

#### 3.7.1. Sorafenib hemmt die Zellproliferation

Die Zellzahlen der drei Ansätze wurden nach 6 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h bestimmt. Drei unabhängige Versuche wurden durchgeführt und die gezählten Zellzahlen gemittelt. Die folgende Grafik zeigt die Ergebnisse dieser drei Versuche.

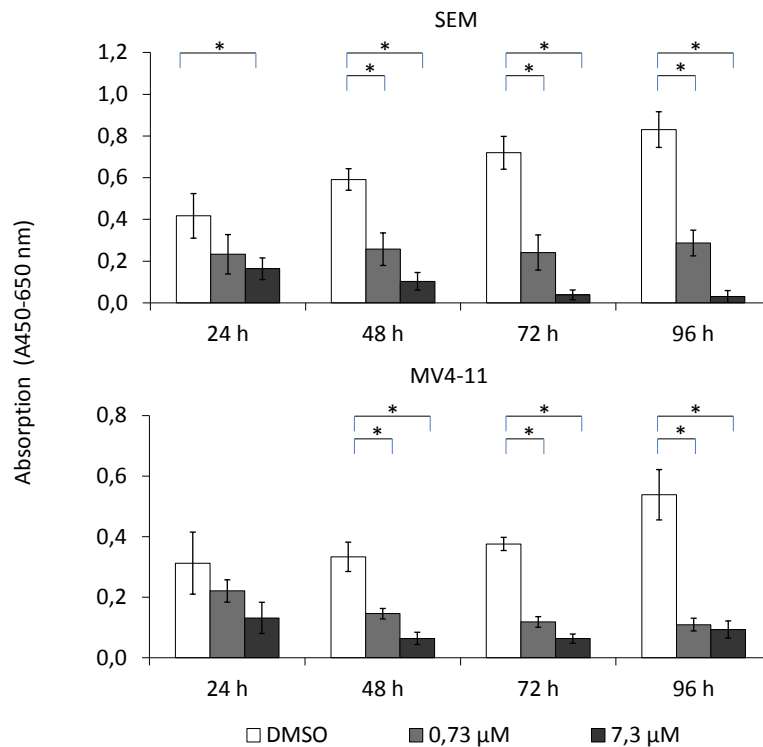


**Abbildung 26: Zellproliferation in Abhängigkeit von der Behandlung mit Sorafenib**  
 Dargestellt sind die zu jedem Zeitpunkt gezählten Zellen nach Behandlung mit Sorafenib. DMSO: Kontrolle, 0,73 µM: 0,73 µM Sorafenib, 7,3 µM: 7,3 µM Sorafenib. Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede mit einem  $p$ -Wert  $< 0,05$ .  $n=3$ .

Eine Behandlung mit Sorafenib führte in beiden Zelllinien zur Abnahme der Zellproliferation. Bei der höheren Konzentration fiel die Zellzahl kontinuierlich auf die Hälfte über den beobachteten Zeitraum ab und stieg nach 96 h wieder leicht an. Schon nach 24 h waren signifikant niedrigere Zellzahlen vorhanden. Die Zelllinie MV4-11 zeigte zunächst bei der geringeren Konzentration eine Stagnation der Zellproliferation. Erst nach 72 h konnten signifikant geringere Zellzahlen gemessen werden. Nach 96 h schließlich war die Zellzahl auf etwa die Hälfte reduziert. Eine Inkubation der Zellen bei 7,3 µM führte bereits nach 24 h zu einem Abfall der Zellzahl. Ein Minimum von ungefähr einem Drittel der Ausgangszellzahl wurde nach 96 h verzeichnet.

### 3.7.2. Einfluss von Sorafenib auf die metabolische Aktivität

Zusätzlich wurde der Einfluss von Sorafenib auf die metabolische Aktivität untersucht. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die gemessenen Werte nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h sind in der folgenden Grafik dargestellt.



**Abbildung 27: Metabolische Aktivität der mit Sorafenib behandelten Zellen**

Dargestellt sind die Mittelwerte. Die Absorption wurde gemessen bei 450 nm und 650 nm. DMSO: Kontrolle, 0,73 µM: 0,73 µM Sorafenib, 7,3 µM: 7,3 µM Sorafenib. n=3

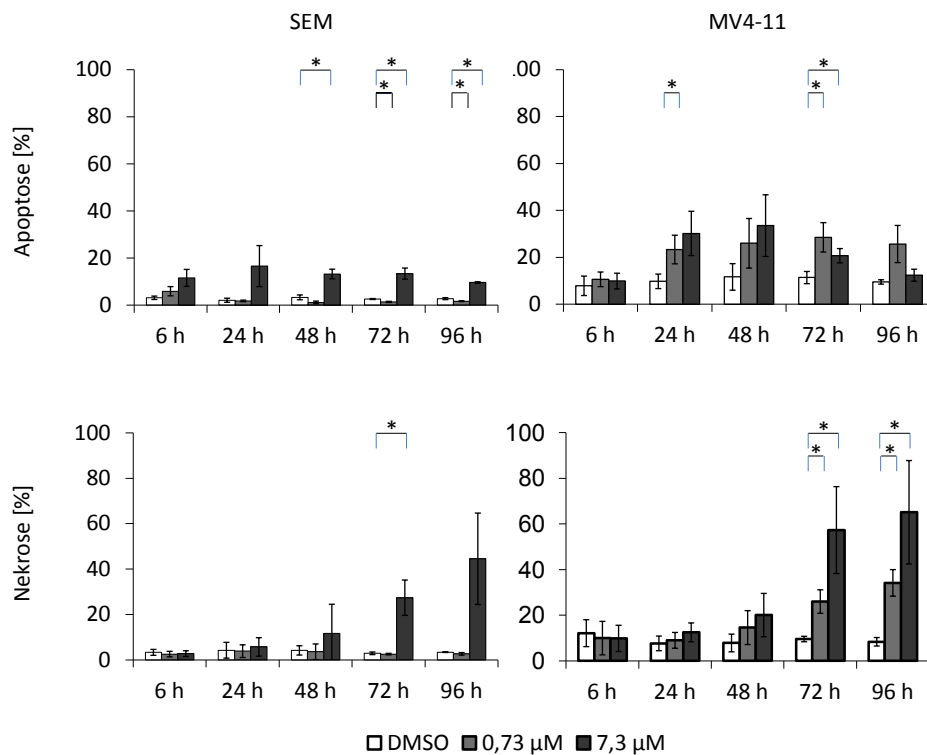
Die Abbildungen zeigen in beiden Zelllinien einen starken Einfluss von Sorafenib auf die metabolische Aktivität der Zellen. Schon nach 24 h zeigte die Zelllinie SEM signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und den mit der hohen Konzentration behandelten Zellen. Die metabolische Aktivität fiel bei einer Sorafenib-Konzentration von 7,3 µM stetig ab, während sie bei der Kontrolle erwartungsgemäß zunahm. Bei der geringeren Konzentration von 0,73 µM Sorafenib blieb die metabolische Aktivität über den beobachteten Zeitraum nahezu unverändert. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle wurde nach 48 h Beobachtungszeit nachgewiesen. Anders ist es bei der Zelllinie MV4-11. Die gemessenen Werte fielen auch bei einer Konzentration von 0,73 µM ab. Ebenso liegt nach 48 h ein signifikanter Unterschied zur

Kontrolle vor. Bei höherer Konzentration nahm die metabolische Aktivität stärker ab und zeigte ebenfalls nach 48 h einen signifikanten Unterschied. Nach 72 h wurde ein Minimum erreicht, worauf die metabolische Aktivität wieder leicht anstieg.

### *3.7.3. Apoptose- und Nekroseraten unter der Behandlung mit Sorafenib*

Die sinkenden Zellzahlen im beobachteten Zeitraum zeigten, dass Zellen während des Versuches durch die Einwirkung von Sorafenib zugrunde gingen. Um die genauen Raten der apoptotischen und nekrotischen Zellen zu ermitteln, wurden durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche wurden gemittelt.

Eine Inkubation mit einer Konzentration von 7,3  $\mu\text{M}$  Sorafenib führte bei der Zelllinie SEM bereits nach 6 h zu einer erhöhten Apoptoserate. Die Apoptoserate erreichte nach 24 h ihren Höhepunkt von 17 Prozent gegenüber zwei Prozent in den Kontrollzellen und sank danach leicht ab. Bei niedriger Sorafenib-Konzentration zeigten sich signifikant verminderte Apoptoseraten im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Nekroserate der Zelllinie SEM, die auch spätapoptotische Zellen umfasst, zeigte bei hoher Konzentration an Sorafenib erst nach 48 h eine Zunahme gegenüber der Kontrolle. Die Nekroserate stieg bis zu einem Maximum von 45 Prozent nach 96 h an. Bei niedrigerer Konzentration an Sorafenib blieb die Nekroserate auf dem Niveau der Kontrollzellen (ein bis zwei Prozent). Die Zelllinie MV4-11 zeigte auch bei niedriger Sorafenib-Konzentration nach 24 h einen Anstieg der Apoptoserate, die nach 72 h ein Maximum von fast 30 Prozent erreichte und danach wieder leicht abfiel. Bei hoher Konzentration wurde ebenfalls ein Anstieg bis auf fast 35 Prozent beobachtet, der jedoch schon nach 48 h sein Maximum erreichte. Die Nekroserate begann bei beiden untersuchten Konzentrationen nach 48 h erkennbar zu steigen und stieg bis zu einem Maximum nach 96 h von 35 Prozent bei niedriger Konzentration und 65 Prozent bei hoher Sorafenib-Konzentration.



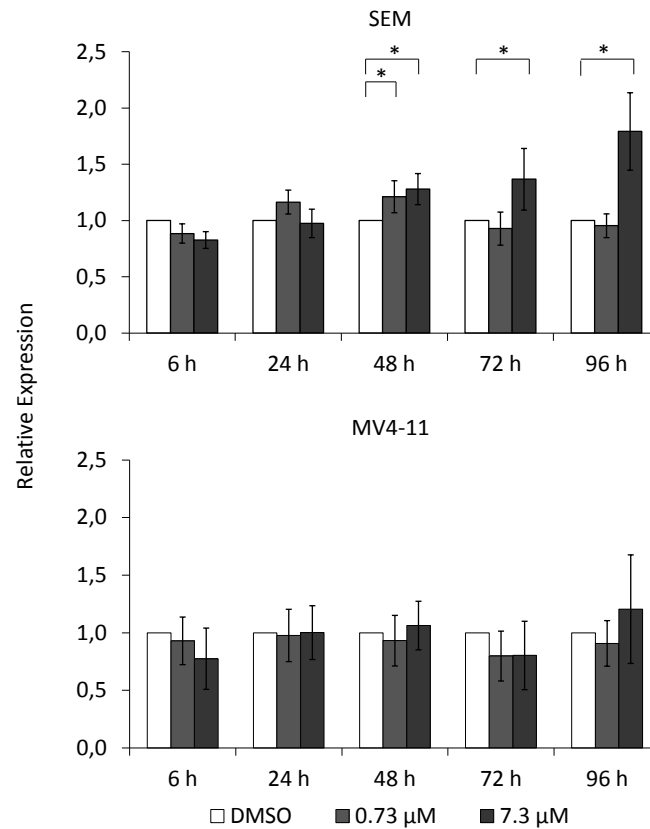
#### **Abbildung 28: Apoptose- und Nekroseraten unter der Behandlung mit Sorafenib**

Dargestellt sind die mittels Durchflusszytometrie gemessenen Raten der apoptotischen und nekrotischen Zellen der beiden Zelllinien SEM und MV4-11. DMSO: Kontrolle, 0,73 µM: 0,73 µM Sorafenib, 7,3 µM: 7,3 µM Sorafenib.  $n=3$

#### **3.7.4. Einfluss von Sorafenib auf die Expression der miR-155**

Schließlich wurde die Expression der miR-155 unter dem Einfluss von Sorafenib geprüft. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurde die miRNA aus den Zellen isoliert und die Expression mittels qPCR untersucht.

In den MV4-11-Zellen wurde im Verlauf des Versuches keine Änderung in der miR-155-Expression beobachtet. Die Expression blieb über den gesamten Zeitraum bei beiden Sorafenib-Konzentrationen stabil. Die Zelllinie SEM hingegen zeigte bei der geringeren Konzentration von 0,73 µM eine Expression, die zu Beginn des Versuches leicht auf das 1,2-Fache anstieg und nach 72 h wieder den Ausgangswert erreichte. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen zeigten sich nur zum Zeitpunkt 48 h. Eine Inkubation mit 7,3 µM Sorafenib führte zum signifikanten Anstieg der miR-155-Expression. Hier lag in den behandelten Zellen nahezu das Doppelte der miR-155-Expression vergleichen mit den unbehandelten Zellen vor.



**Abbildung 29: Expression der miR-155 unter dem Einfluss von Sorafenib**

Dargestellt sind die mittels qPCR ermittelten Expressionswerte der miR-155 zu den verschiedenen Zeitpunkten. Als Kontrolle dienten die mit DMSO inkubierten Zellen, welche rechnerisch auf 1 gesetzt wurden. Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede mit einem  $p$ -Wert  $< 0,05$ .  $n=3$

## 4. Diskussion

miRNAs sind eine Klasse von regulativen Molekülen, die zunehmende Bedeutung in der Erforschung maligner Krankheiten erlangen. Die miR-155 wurde bereits in verschiedenen soliden Tumoren als deregulierte miRNA beschrieben. Außerdem spielt sie in der Regulation der Immunantwort auf verschiedene Reize eine wichtige Rolle. Damit könnte sie ein Bindeglied zwischen Inflammation und der Entstehung maligner Erkrankungen sein.[80] Auch in vielen hämatologischen Erkrankungen wurde eine Dysregulation der miR-155 beschrieben und erste funktionelle Erkenntnisse in diesen Erkrankungen wurden gewonnen. Die vorliegende Arbeit verbindet deskriptive Aspekte, wie die Bestimmung der Expression der miR-155 in verschiedenen Leukämien, mit funktionellen Untersuchungen zur Zellhomöostase. Im Folgenden sollen die gewonnenen Erkenntnisse mit aktuellen Studien verglichen und in einen größeren Zusammenhang eingebettet werden.

### 4.1. miR-155/BIC in akuten Leukämien und gesunden Zellen

Im ersten Teil der Promotionsarbeit wurde die Expression der miR-155 in verschiedenen hämatologischen Zellen untersucht. Dazu gehörten elf Zelllinien (drei B-ALL, zwei T-ALL, drei AML und drei hochmaligne NHL), HSZ, B-Lymphozyten und 58 *de novo*-Leukämieproben. Die Zelllinien und *de novo*-Leukämieproben wiesen unterschiedliche zytogenetische und molekularbiologische Eigenschaften auf, mit denen die miR-155-Expression verglichen werden sollte. Mittels qPCR, welche eine Methode darstellt, die sehr spezifisch die Expression misst, und im Gegensatz zu anderen miRNA-Analysemethoden, wie dem *Northern Blot*, eine hohe Sensitivität aufweist, wurde die Expression der miR-155 und seines Vorläufers BIC bestimmt. Es wurde eine relative Bestimmung der Expression durchgeführt. Die gemessenen Expressionswerte wurden mit einer Kontrollzellgruppe (HSZ) verglichen, wodurch eine anschauliche Darstellung erreicht werden konnte. Jedoch schränkt dies auch die Vergleichbarkeit mit anderen Studien ein, die nicht dieselben Vergleichszellen verwendeten.

In allen untersuchten Zellpopulationen konnte die miR-155 nachgewiesen werden. Von den fünf ALL-Zelllinien zeigte nur eine B-ALL Zelllinie (SEM) eine Expression der miR-155, welche die Expression der HSZ übertraf. Diese Zelllinie besitzt jedoch keine bislang beschriebene zytogenetische oder molekularbiologische Auffälligkeiten, die mit hoher miR-155-Expression assoziiert ist. Eine direkte Ursache für die erhöhte Expression der miR-155 konnte nicht gefunden werden. Eine Erhöhung der Expression durch vermehrte Transskripti-

on des Genes erscheint wahrscheinlich. Alle anderen ALL-Zelllinien zeigten eine signifikant geringere Expression als diejenige der HSZ. Im Vergleich zu reifen B-Lymphozyten war die Expression der miR-155 in den B-ALL-Zelllinien REH und RS4;11 auf etwa das 1,5-Fache gesteigert. Die T-ALL-Zelllinie MOLT-4 wies die geringste miR-155-Expression unter allen ALL-Zelllinien auf. Keine der untersuchten ALL-Zelllinien besitzt zytogenetische Auffälligkeiten, die den Genlokus 21q21 einschließen bzw. andere molekulare Merkmale, welche mit dysregulierter miR-155-Expression einhergehen. Bei der Untersuchung der Expression der pri-miR-155 (BIC) wurde ebenfalls die höchste Konzentration in der Zelllinie SEM gemessen, deren Wert den der HSZ um das 4,5-Fache übersteigt, wogegen alle anderen ALL-Zelllinien eine geringe Expression zeigten. Dies legt nahe, dass die erhöhte Expression in dieser Zelllinie durch eine verstärkte Expression des Gens BIC erfolgt. Verglichen mit den HSZ war die Expression von BIC in den B-ALL-Zelllinien auf ca. die Hälfte verringert, in den T-ALL-Zelllinien auf ein Viertel bis ein Drittel. Die BIC-Expression spiegelt somit die Expression der miR-155 wie erwartet wider. Die in früheren Studien gemachte Beobachtung, dass Jurkat, eine T-ALL Zelllinie, kaum BIC exprimiert, ist durch die geringere Sensitivität des Verfahrens *Northern Blot* zu erklären.[52, 68]

Bei den AML-Zelllinien stach die Zelllinie MV4-11 mit einer miR-155-Expression heraus, die das Doppelte der Expression in HSZ deutlich übertraf. Diese Zelllinie besitzt eine FLT3-ITD-Mutation, welche mit einer erhöhten Expression der miR-155 und verminderter Expression der miR-144 und miR-451 assoziiert ist.[90, 94, 95] Die beiden AML-Zelllinien NB-4 und HL-60, die keine FLT3-Mutation aufweisen, zeigen nur eine moderate Expression der miR-155. NB-4 exprimiert die miR-155 auf dem Niveau der HSZ, HL-60 zeigt eine Expression, die auf die Hälfte reduziert ist. Beide Zelllinien haben keine zytogenetischen Auffälligkeiten, die mit der Expression der miR-155 nach bisherigem Wissensstand in Zusammenhang stehen. Unterschiede zu publizierten Studien, wonach die Zelllinie HL-60 keine miR-155 exprimiert, sind wiederum durch geringere Sensitivität des *Northern Blots* zu erklären.[52] HL-60 und TPH-1 Zellen (AML M2 bzw. M5), die häufig zur Untersuchung von Differenzierungsprozessen verwendet werden, zeigen eine Zunahme der miR-155-Expression im Verlauf der Differenzierung.[96, 97] Die Differenzierung wurde hierbei durch TPA (Tetradecanoyl-Phorbolacetat) induziert. TPA induziert die Proteinkinase C (PKC) und aktiviert den ERK/MAPK-Signalweg. Dadurch wird der Differenzierungsprozess eingeleitet.[98] Dies erklärt die vermehrte Expression der miR-155 im Verlauf der Differenzierung, da die PKC sowie der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B an der Induktion der Transkription von BIC mitbeteiligt sind.[72] Die höchste Expression des BIC-Gens zeigt ebenfalls die Zelllinie MV4-11. Die



Expression übersteigt die Expression in HSZ um etwa das 5-Fache. Die starke Expression des BIC-Gens legt nahe, dass die erhöhte Expression der miR-155 in AML mit FLT3-ITD-Mutation durch eine gesteigerte Transkription dieses Gens zustande kommt und nicht durch eine effizientere Prozessierung oder einen verminderten Abbau. Die anderen beiden AML-Zelllinien zeichneten sich durch eine moderate Expression aus, die den Expressionswerten der miR-155 entspricht.

Die Expression in den hochmalignen NHL-Zelllinien ist, verglichen mit den HSZ, deutlich geringer. Alle in dieser Arbeit verwendeten hochmalignen NHL-Zelllinien stammen von Patienten, die an einem Burkitt-Lymphom erkrankt waren. Die Zelllinie DogKIT zeigte die geringste miR-155-Expression aller Zellen. Die Zelllinien DoGUM und GumBus zeigten eine um etwa auf die Hälfte reduzierte Expression verglichen mit den HSZ. Viele Studien beschäftigen sich mit der Expression von BIC/miR-155 in Lymphomen, weshalb zu diesen Erkrankungen viele Daten vorliegen. Es wurde zunächst berichtet, dass die pri-miR-155 BIC besonders in Hodgkin-Lymphomen (HL) nicht oder nur sehr schwach dagegen in NHL exprimiert wird.[68] Eine vermehrte Methylierung des BIC-Gens wurde für die geringe Expression der miR-155 in NHL-Zellen verantwortlich gemacht. Es wurde außerdem vermutet, dass BIC in Kooperation mit dem Protoonkogen c-Myc an der Entstehung von Lymphomen in Vögeln beteiligt ist.[99, 100] Dieser Zusammenhang konnte jedoch für menschliche Zelllinien nicht bestätigt werden. Die große Mehrzahl der BL-Proben, die eine Translokation des c-Myc-Gens aufweisen, zeigen keine oder eine sehr geringe Expression des BIC-Gens.[71] Dies mag auch daran liegen, dass AID (*Activation Induced Cytidine Deaminase*) durch die miR-155 reguliert wird. Neben der somatischen Hypermutation zur Diversifizierung von Immunglobulinen ist dieses Enzym auch an der Myc-Igh-Translokation beteiligt. Die Autoren vermuten, dass der miR-155 gar eine tumorsuppressive Wirkung in aktivierten B-Lymphozyten zukommt, die die inverse Korrelation zwischen Myc-Translokation und BIC-Expression erklärt.[101] Die hier untersuchten BL-Zelllinien wiesen alle eine Translokation des Myc-Gens auf. Alle hgNHL-Zelllinien wiesen, wie bei BL mit Myc-Translokation erwartet, geringe Expressionswerte der miR-155 auf. Lediglich die Zelllinie GumBus zeigte bei moderater miR-155-Expression eine starke Expression des Gens BIC.

Außerdem wurde in BL-Zellen ein Zusammenhang zwischen der Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und der Expression von BIC beschrieben. Es zeigte sich, dass BL-Zellen, die eine latente EBV-Infektion aufwiesen, BIC stärker exprimierten als EBV-negative Zellen. Dies gilt aber nur für Zellen, welche LMP-1 (*Latent Membrane Protein 1*) und EB-

NA-2 (*Epstein-Barr Nuclear Antigen 2*) exprimieren.[71] LMP1 verursacht die Induktion der Expression von BIC durch den NF- $\kappa$ B-Signalweg.[102] Die miR-155 wiederum hemmt die Aktivität des NF- $\kappa$ B-Signalweges, sodass ein negativer Feedback-Mechanismus besteht.[103] Interessanterweise können Viren auch Gene für miRNAs enthalten, die orthologe zu endogenen miRNAs darstellen, wie es für die miR-155 durch das Herpesvirus 8 (HHV8) gezeigt wurde.[104] Alle in dieser Arbeit untersuchten BL-Zelllinien (DogKIT, DoGUM und GumBus) sind EBV-negative Zelllinien. Analog zu den genannten Studien weisen die beiden erstgenannten nur eine geringe Expression von BIC auf. Lediglich GumBus exprimiert BIC deutlich stärker. Es wurde außerdem ein Zusammenhang zwischen der Infektion mit EBV und der Prozessierungseffizienz beschrieben. Demnach konnte in EBV-negativen BL-Zelllinien ein Block in der Prozessierung von BIC zur reifen miR-155 nachgewiesen werden. Die Zellen zeigten selbst bei forcierter Expression von BIC geringe miR-155-Werte. Bei mit EBV infizierten Zellen, welche LMP1 und EBNA-2 exprimieren, wurde dieser Block in der Prozessierung nicht beobachtet.[72] Die Zelllinie GumBus zeichnet sich durch geringe miR-155-Expressionwerte bei gleichzeitig gesteigerter BIC-Expression aus. Dies spricht für eine verminderte Prozessierung, wie es für EBV-negative BL-Zelllinien beschrieben wurde. Der Quotient aus der Expression der miR-155 und der Expression des Gens BIC macht dies deutlich und lässt Rückschlüsse auf die Effektivität der Prozessierung zu.[52] Eine andere Studie kommt zu einem gegenteiligen Ergebnis. BL-Zellen zeigten im Gegensatz zu DLBCL-Zellen generell eine gute Effizienz bei der Prozessierung von BIC zur reifen miR-155. Geringe miR-155-Werte sind demnach auf eine geringe Expression von BIC zurückzuführen.[105] Dies entspricht den Expressionswerten der Zelllinien DogKIT und DoGUM in dieser Arbeit, welche eine gute Effizienz der Prozessierung zeigen, obwohl sie EBV-negativ sind. Die Diskrepanz in den Ergebnissen dieser beiden Studien wird von Zhang et al. dadurch erklärt, dass eine geringe miR-155-Expression in BL-Zellen möglicherweise einen Selektionsvorteil bieten könnte. Zellen, die die Prozessierung von BIC zur reifen miR-155 bei starker BIC-Expression drosseln können, überwiegen demnach, da sie einer Proliferationshemmung oder der Apoptose entgehen können.[105] Im Gegensatz zu DLBCL, in denen die Expression der miR-155 in hohem Maße von einer EBV-unabhängigen, konstitutiv erhöhten Aktivität von NF- $\kappa$ B abhängt, bestimmen in BL-Zellen die Infektion mit EBV und die Prozessierung der miR-155 die Expression.[106]

Auch gesunde B-Lymphozyten exprimierten die miR-155 ungefähr auf dem Niveau der Zelllinien DoGUM und GumBus. Dies entspricht der Studie von van den Berg et al., die BIC in B-Lymphozyten im lymphatischen Gewebe nachweisen konnte.[68]

#### 4.2. Expression der miR-155 in de novo-Zellen

miRNAs haben das Potenzial, als Biomarker für Patienten, die an einer akuten Leukämie erkrankt sind, im klinischen Alltag zu dienen. Sie könnten als diagnostische oder prognostische Marker verwandt werden. Eine genaue Diagnose und die Abschätzung der individuellen Prognose eines jeden Patienten haben einen unmittelbaren Einfluss auf die Wahl der Therapie. So ist es beispielsweise möglich, durch das Expressionsprofil dreier miRNAs (let-7b, miR-128 und miR-223) die Unterscheidung zwischen ALL und AML zu treffen. Die miR-181a kann die Subtypen M4 und M5 von den Subtypen M1 und M2 differenzieren.[107] Zum anderen besitzen manche miRNAs prognostische Bedeutung in verschiedenen malignen Erkrankungen (siehe 4.2.1.). Über die Bedeutung der miR-155 liegen insbesondere im Bezug auf ALL kaum Daten vor. Die Bedeutung der miR-155 für Diagnose und Prognose akuter Leukämien wurde durch den Vergleich des Expressionsprofils mit klinischen Daten untersucht.

Insgesamt wurden 58 Proben von Patienten mit einer akuten Leukämie untersucht (45 AML-Patienten, 13 ALL-Patienten). Die Expression der miR-155 wurde mit HSZ verglichen, die zuvor aus gesundem Knochenmark isoliert worden waren. Von den insgesamt 45 AML Proben zeigte die Mehrzahl (91 Prozent) eine gegenüber HSZ verminderte miR-155-Expression. Nur vier Proben exprimierten die miR-155 stärker. O'Connell et al. konnten zeigen, dass eine forcierte miR-155-Expression zu einer Expansion der Monozyten und Granulozyten mit Dysplasien bei Mäusen führte. In dieser Arbeit wurde außerdem die miR-155-Expression in AML-Proben untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die miR-155 im Knochenmark von AML-Patienten höher exprimiert wurde als in gesundem Knochenmark.[56] Die Unterschiede in den Ergebnissen sind darauf zurückzuführen, dass die Proben in der zitierten Studie nicht über eine Dichtezentrifugation aufgearbeitet wurden. Dies bedeutet, dass einerseits in den AML-Proben ein heterogeneres Zellbild betrachtet wurde als in dieser Arbeit. Außerdem wurden zur Kontrolle gesunde Knochenmarkproben untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine Fokussierung auf CD34+/CD45+ HSZ vorgenommen. Diese Zellen stellen nur ca. drei bis sechs Prozent der Zellen des gesunden Knochenmarks. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass multipotente HSZ typischerweise eine höhere Expression der miR-155 aufweisen als die daraus hervorgehenden oligopotenten Progenitorzellen der einzelnen Zellreihen.[67]

#### 4.2.1. Prognostische Bedeutung der miR-155

Die prognostische Bedeutung der miR-155 ist für verschiedene solide Tumoren belegt.[63, 65] Über die prognostische Bedeutung der miR-155 in akuten Leukämien ist wenig bekannt.

Um die prognostische Bedeutung der miR-155 in AML zu untersuchen, wurden zunächst die Patienten ausgeschlossen, welche eine Mutation der FLT3 aufweisen und allein dadurch eine ungünstige Prognose haben. Auch Patienten mit NPMc+ AML wurden ausgeschlossen, da diese mit einer günstigen Prognose assoziiert sind. Um das Patientenkollektiv weiter zu vereinheitlichen, wurden nur Patienten berücksichtigt, die gemäß den zytogenetischen Befunden ein intermediäres Risiko hatten. Primär palliativ behandelte Patienten wurden ebenfalls nicht in die Analyse miteinbezogen. Insgesamt verblieben 20 AML-Patienten. Diese wurden in zwei gleichgroße Gruppen eingeteilt und das Überleben der Patienten mit höherer Expression mit dem der Patienten mit verminderter Expression verglichen. Es zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen diesen beiden Gruppen bestand. Beide Patientengruppen zeigten einen annähernd parallelen Verlauf des kumulativen Überlebens. Dies deutet darauf hin, dass die Höhe der miR-155-Expression vermutlich kein prognostischer Faktor ist. Wegen des kleinen Patientenkollektivs von nur 20 Patienten ist eine prognostische Bedeutung jedoch nicht ausgeschlossen. Eine hohe miR-155-Expression ist jedoch mit verschiedenen zytogenetischen oder molekularbiologischen Faktoren assoziiert, die einen Einfluss auf das Überleben haben. Eine neuere Studie proklamierte ein Prognose-System in Abhängigkeit von der Expression dreier miRNAs. Auch für die miR-155 zeigt sich eine prognostische Bedeutung.[108] Die Unterschiede zu den hier analysierten Daten sind zum einen im deutlichen größeren Patientenkollektiv zu sehen. Außerdem erfolgte die Selektion der Patienten, welche in die Analyse eingeschlossen wurden, lediglich nach der geplanten Therapie (Induktions-Chemotherapie vs. palliative bzw. zytoreduktive Therapie). Eine Selektion anhand von zytogenetischen Risikogruppen erfolgte nicht. Eine weitere Studie zeigte ebenfalls, dass eine hohe miR-155-Expression ein ungünstiger prognostischer Marker ist. Dies zeigte sich sowohl im Hinblick auf das krankheitsfreie Überleben wie auch auf das Gesamtüberleben. In dieser Studie wurde allerdings die Expression des Gens BIC (MIR155HG) als Näherung für die miR-155-Expression bestimmt.[109] Analysen zur prognostischen Bedeutung der miR-155 in akuten lymphatischen Leukämien konnten wegen geringer Fallzahl und sehr heterogenen zytogenetischen Befunden nicht durchgeführt werden. Hier wäre die Analyse eines größeren Patientenkollektivs wünschenswert. Pedersen et al. vermuteten, dass SHIP als prognostischer

Marker in DLBCL gelten könnte.[110] Die miR-155-Expression ist jedoch auch in DLBCL nicht als prognostischer Marker etabliert.

Die Isolierung von leukämischen Blasten aus dem Blut oder Knochenmark und die nachfolgende Extraktion der RNA aus diesen Zellen ist ein aufwändiger Prozess. Besonders die Isolierung der Zellen aus dem Knochenmark stellt für den Patienten ein invasives Verfahren dar. Die Arbeitsschritte zur Anreicherung der Zellpopulation und die Schritte zur Gewinnung der RNA und nachfolgende Messung sind arbeitsaufwändig. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die miR-155 auch im Serum von Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen nachgewiesen werden kann.[111] Insbesondere bei Patienten mit Mammakarzinom zeigt sich eine hohe Sensitivität und Spezifität.[112] Die Bestimmung der miR-155-Konzentration bei Patienten mit akuter Leukämie aus dem Serum würde eine wenig invasive Methode darstellen, die zur Diagnose oder Verlaufsbeobachtung eingesetzt werden könnte. Insbesondere bei Patienten, die keine Blasten in das Blut ausschwemmen, wäre dies ein deutlicher Vorteil. Daher sollte in Zukunft geprüft werden, ob die miR-155 Expression im Serum mit der Expression in den leukämischen Blasten korreliert. Die Bestimmung der miR-155-Expression im Serum könnte so eine Methode darstellen, die auch bei Leukämiepatienten anwendbar ist. Den Verlauf der Krankheit durch diese Methode zu kontrollieren, im Sinne einer MRD-Diagnostik, wäre ein mögliches Einsatzgebiet.

#### *4.2.2. Zusammenhang der miR-155 mit molekularen prognostischen Faktoren*

Erste molekulare Auffälligkeiten wurden beschrieben, die einen Einfluss auf die Prognose der AML haben. Zu den ersten und wichtigsten beschriebenen Faktoren gehört die Interne Tandemduplikationsmutation (ITD) des FLT3-Gens. Die FLT3-Mutation ist bei ca. 25 Prozent aller AML-Patienten nachweisbar und ist damit die häufigste Mutation bei AML.[113] Sie geht mit einer schlechten Prognose der AML einher.[114] Allerdings schwindet die prognostische Bedeutung des FLT3 Status bei Patienten, die 70 Jahre oder älter sind.[95] Der Anteil der mutierten Allele an allen vorhandenen Allelen der FLT3 hat bei Patienten, die außerdem eine Mutation der NPM1 aufweisen, einen großen prognostischen Wert.[115] Die durch die Mutation konstitutiv erhöhte Aktivität der Tyrosinkinase FLT3 führt zu einer vermehrten Synthese von MCL-1 (*Myeloid Cell Leukemia 1*), das für die Viabilität der leukämischen Zellen verantwortlich ist.[116] Die ITD-Mutation liegt meist in der juxtamembranären Bereich der Tyrosinkinase, nur ca. ein Drittel der Mutation liegt in der Tyrosinkinasedomäne 1.[117]

Bei der Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Expression der miR-155 und molekularen prognostischen Faktoren fiel auf, dass die miR-155 in Proben, welche eine Mutation des FLT3-Gens aufweisen (zwölf Prozent) eine deutlich höhere Expression zeigen. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind zwar nicht signifikant, dies könnte jedoch an der geringen Anzahl an Patienten liegen. Außerdem waren die Proben mit dem Nachweis einer FLT3-ITD-Mutation in dem hier untersuchten Patientenkollektiv deutlich unterrepräsentiert. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Studien, die denselben Zusammenhang zwischen der FLT3-Mutation und der Expression der miR-155 zeigten.[90, 118] Eine erhöhte miR-155-Expression wurde im Übrigen nur bei einer ITD-Mutation der FLT3 nachgewiesen. Die FLT3-TKD-Mutation (Tyrosinkinasedomäne) tritt vermehrt bei Patienten mit Inversion des Chromosoms 16 und der Translokation t(8;21) auf. Eine große Bedeutung für die Abschätzung der Prognose scheint die Mutation nicht zu haben.[119] Auch ein Einfluss der FLT3-TKD-Mutation auf die miR-155-Expression ist bislang nicht beschrieben.

Ein ähnlicher Zusammenhang wurde für die Mutation des NPM1-Gens beschrieben. Eine Mutation dieses Gens mit der Expression eines zytoplasmatischen NPM1 soll mit einer Zunahme in der Expression der miR-155 assoziiert sein. Die Zunahme der Expression fällt jedoch deutlich geringer aus als bei der Mutation der FLT3.[90] In den hier untersuchten Proben konnte kein signifikanter Unterschied in den Expressionswerten der miR-155 gemessen werden. Der Unterschied zu der Studie von Garzon et al. kommt vermutlich dadurch zustande, dass bei dem Vergleich der NPMc-positiven gegen die NPMc-negativen AML der FLT3-Status nicht berücksichtigt wurde. Dadurch könnte es zu einer Verzerrung der Ergebnisse kommen, da die FLT3-ITD-Mutation mit einer erhöhten miR-155-Expression und einer höheren Raten an NPMc-positiven Proben assoziiert ist.[95] Dies folgt der Argumentation von Faraoni et al.[118] Ein weiterer prognostischer Marker, Aberrationen des Genlokus 3q26, der ebenfalls mit einer schlechten Prognose einhergeht, zeigt eine Assoziation mit geringer miR-155-Expression.[94] Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der miR-155 auch von der Methylierung der CpG-Inseln im Bereich des MIR155HG (BIC) abhängig ist.[120] Möglicherweise erklärt eine Demethylierung in diesem Bereich die hohe miR-155-Expression in Zellen, welche keine weiteren molekularen oder zytogenetischen Auffälligkeiten besitzen.

#### 4.2.3. Expression der miR-155 in FAB-Subtypen

Die miR-155 wird in unterschiedlichen Zelltypen des gesunden Blutes differenziell exprimiert.[66] Um zu untersuchen, ob sich akute Leukämien mit unterschiedlicher Differenzierung im Hinblick auf die Expression der miR-155 voneinander unterscheiden, wurden die Proben anhand ihrer FAB-Klassifikation in vier Gruppen unterteilt. In der ersten Gruppe befanden sich die Proben mit geringer Differenzierung (M0, M1 und M2), zur zweiten Gruppe gehörte nur die akute Promyelozyten Leukämie (APL: M3), die dritte Gruppe umfasste die myelomonozytären und monozytären akuten Leukämien (M4 und M5) und die vierte Gruppe bestand aus den Subtypen M6 und M7 (erythrozytäre und megaloblastäre Leukämien). Es zeigte sich, dass die wenig differenzierte Gruppe (M0, M1 und M2) und die myelomonozytären und monozytären Leukämien eine ähnliche Expression der miR-155 aufwiesen. Die APL dagegen zeigte gegenüber beiden Gruppen eine signifikante Reduktion der miR-155. Auch die Gruppe, welche die Subtypen M6 und M7 umfasste, zeigte eine geringere Expression. Unterschiede zu den anderen Gruppen waren jedoch nicht signifikant. Beide APL-Proben wiesen die für diese Leukämien typische Translokation t(15;17) mit dem daraus resultierenden Fusionsgen PML-RAR $\alpha$  auf. Die charakteristische Translokation mit resultierendem Fusionsgen mag das Hauptereignis in der Entstehung dieser Leukämieform darstellen. Dies kann erklären, weshalb andere Signalwege, hier am Beispiel der miR-155, kaum dysreguliert sind.

#### 4.3. Methodische Aspekte der Transfektionsversuche

Hemmungs- und Überexpressionsversuche wurden durchgeführt, um den Einfluss der miR-155 auf Zellviabilität und Proliferation zu untersuchen. Zellzählungen und WST1-Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen haben eine große Aussagekraft bezüglich des Proliferationsverhältnisses. Die Messung der Apoptose- und Nekroseraten beurteilt die Induktion von Zelltodprozessen.

Die Bestimmung der Transfektionseffizienz zeigte, dass in allen untersuchten Zelllinien eine Transfektionsrate von über 80 Prozent erreicht wurde. Diese Rate an transfizierten Zellen wurde als ausreichend groß erachtet. Auch in anderen Studien sind an verschiedenen Zelllinien Versuche mit Inhibitoren durchgeführt worden. Die Methoden der Inhibition der miR-155 unterschieden sich mitunter von der in dieser Arbeit durchgeführten. Eine Arbeitsgruppe verwendete „Schwämme“, welche aus acht zur miR-155 komplementären Strängen in einem Vektor bestanden. Hierdurch konnte miR-155 im Zytoplasma sequestriert und eine effektive

Inhibition erreicht werden.[100] Eine neuere Methode verwendet Peptidnukleinsäuren (PNA), bei denen das Zuckergerüst der RNA durch ein Peptidstrang ersetzt wird. Dies führt zu einer verbesserten Stabilität der Moleküle. Außerdem benötigen diese Moleküle keine Transfektionsmethoden, um das Zytoplasma zu erreichen und sind daher auch in vivo einsetzbar.[121] Auch Banerjee et al. erreichten durch die alleinige Inkubation von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten ohne zusätzliche Transfektionsmethoden eine Inhibition der miR-155 in vitro.[59] Es wurden außerdem Inhibitoren synthetisiert, welche die Sequenz mehrerer miRNAs besitzen, wodurch eine Inhibition verschiedener miRNAs erreicht werden konnte. Diese Inhibition mit einem mehrere miRNAs inhibierenden Oligonukleotides war dabei gegenüber einem Gemisch aus einzelnen Inhibitoren überlegen.[122]

Ceppi et al. führten an humanen dendritischen Zellen Inhibitionsversuche mit dem in dieser Arbeit verwendeten miR-155-Inhibitor aus. Es wurde für die Transfektion mittels Elektroporation jedoch eine höhere Konzentration des Inhibitors und eine geringere Anzahl zu transfizierender Zellen genutzt (24 µl Inhibitor auf 100 µl Zellsuspension mit  $0,2 \times 10^7$ ). Die in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen konnte eine ähnlich effektive Inhibition erreicht werden.[62] Die Inhibition der miRNAs durch spezifische Inhibitoren erfolgt jedoch nicht durch Degradierung der miRNA, sondern durch komplementäre Bindung der miRNA im Bereich der *Seed*-Region im Argonautkomplex.[123] Um eine effektive Hemmung der miR-155 durch einen Inhibitor durch qPCR nachzuweisen, muss man jedoch davon ausgehen, dass die Bindung der miR-155 in einer Degradierung der miR-155 mündet. Dies könnte erklären, weshalb keine effektivere Inhibition durch qPCR nachweisbar ist. Von einer effektiven Inhibition der Funktion der miRNA ist jedoch auszugehen. Eine andere Arbeit konnte eine wesentlich effektivere Inhibition der miR-155 erreichen. Die Transfektionsmethode mit Lipofectamin mag hier eine Rolle spielen.[124] Möglicherweise wird hierdurch ein höherer Anteil der Zellen transfiziert. Außerdem ist die Inkubation über einen wesentlich längeren Zeitraum (24 h) eine weitere Erklärung für die Effektivität der Inhibition.

#### 4.4. Funktionelle Bedeutung der miR-155

Da gezeigt wurde, dass eine alleinige Überexpression der miR-155 zu einer proliferativen Knochenmarkserkrankung führen kann, lag die Vermutung nahe, dass die miR-155 einen direkten Einfluss auf die Proliferation in leukämischen Zelllinien haben könnte.[56, 77] Es erfolgten Transfektionsversuche mit Inhibitoren der miR-155 sowie Überexpressionsversuche.



Im Verlauf der Versuche wurden Zellzählungen durchgeführt, um die Proliferation in den unterschiedlichen Ansätzen zu untersuchen. Ein Effekt auf die Proliferation der Zelllinien konnte weder bei Hemmung der miR-155 noch bei Überexpression gezeigt werden. Die Hypothese, dass die miR-155 einen Einfluss auf die Proliferation in leukämischen Zelllinien hat, konnte somit widerlegt werden. Dies ist im Einklang mit einer Studie, die zeigte, dass eine Stimulation der miR-155 in gesunden B-Lymphozyten keinen Einfluss auf die Proliferation hat.[58] Hingegen konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der miR-155-Expression durch Antagonisten von TNF $\alpha$ , wie Etanercept und Infliximab, zu einem geringen antiproliferativen Effekt in DLBCL-Zelllinien führte. Dieser antiproliferative Effekt ist aber vermutlich nicht allein auf die Hemmung der miR-155 zurückzuführen.[110] Dafür spricht auch, dass eine alleinige Inhibition der miR-155 in lymphoblastischen Zellen zu keiner Veränderung der Proliferation oder Apoptose führte.[103] Eine andere Studie konnte jedoch zeigen, dass eine Inkubation der Zelllinie Jurkat mit einem miR-155-Inhibitor zu einer Hemmung der Proliferation führt.[125] In Hühner-Lymphomzellen konnte ebenfalls die Hemmung eines Zielgens der miR-155 eine Hemmung der Proliferation durch Induktion der Apoptose bewirken.[100] In soliden Tumoren konnte ein Effekt der miR-155 auf Proliferation und Apoptose nachgewiesen werden.[126] Dies geschieht vermutlich durch Regulation der Expression des Transkriptionsfaktors FOXO3a. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert unter anderem die Expression proapoptotischer Proteine wie Bim und p27.[91] Außerdem scheint die miR-155 ihre onkogene Wirkung durch den SOCS1/JAK/STAT3-Signalweg zu vermitteln.[80] Die ausbleibende Wirkung der miR-155-Überexpression auf die Proliferation in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass die Zelllinien durch andere Faktoren bereits ein stark gesteigertes Zellwachstum haben. Eine weitere Steigerung durch die miR-155 ist daher nicht möglich. Die metabolische Aktivität wurde mittels WST1-Test bestimmt. Im Verlauf des Versuches nahm die metabolische Aktivität in beiden Zelllinien stetig zu. Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen wurden auch hier nicht beobachtet. Die Zunahme der metabolischen Aktivität der jeweiligen Zellsuspension ist durch die Zunahme der Gesamtzellzahl zu erklären.

Apoptose- und Nekroseraten wurden mittels Durchflusszytometrie im Verlaufe der Versuche bestimmt, um einen möglichen Einfluss der miR-155 auf Zelltodprozesse zu untersuchen. Es zeigte sich wiederum kein Unterschied in den Apoptose- und Nekroseraten nach Inhibition oder Überexpression der miR-155. Die zu Beginn der Versuche relativ hohen Apoptosewerte fielen im Verlauf ab. Die hohen Apoptose- und Nekroseraten zu Beginn des Versuches sind auf das relativ zytotoxische Verfahren der Elektroporation zurückzuführen. Nur die Zelllinie

Jurkat zeigt eine ansteigende Apoptoserate im Verlauf des Versuches, die vermutlich auf die schnelle Proliferation zurückzuführen ist, die zu einer Apoptoseinduktion der beengt wachsenden Zellen führt. Die Nekroseraten zeigten stabile Werte, die lediglich in der Zelllinie RS4;11 nach 48 h einen deutlichen Anstieg verzeichneten. Da Unterschiede in allen drei Zelllinien zwischen den Ansätzen nicht zu sehen sind, ist ein direkter Einfluss der Überexpression auch auf die Apoptoseinduktion bzw. die Nekrose nicht zu vermuten. Die bereits erwähnte Studie von Kong et al., die eine Apoptoseinduktion in Mammkarzinom-Zelllinien durch Hemmung der miR-155 nachweisen konnte, widerspricht den Ergebnissen in dieser Arbeit jedoch.[91] In B-Lymphozyten konnte die Apoptoseinduktion durch Hemmung der miR-155 jedoch dadurch umgangen werden, dass mehr antiapoptotisches BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) exprimiert wurde.[57] Die mRNA von BCL-2 ist ein direktes Ziel der miR-155.[127] Ob das antiapoptotische Protein BCL-2 auch in den untersuchten Zelllinien eine Rolle spielt, wäre noch zu untersuchen. Eine Inhibition der miR-155 scheint einen Einfluss auf die proapoptotische Caspase-3 in Jurkat-Zellen zu haben. Ein Einfluss auf den Anteil apoptotischer Zellen, wie in dieser Arbeit durchgeführt, wurde jedoch nicht untersucht.[125] Eine Arbeit konnte einen tumorsuppressiven Effekt der miR-155 durch Induktion der Apoptose in dendritischen Zellen nachweisen. Dies geschieht vermutlich durch die Regulation von Inhibitoren Cyklin-abhängiger Kinasen, welche in Zellen, die vermehrt miR-155 exprimieren, kumulieren. Dies widerspricht den Erkenntnissen in vielen malignen Erkrankungen mit hoher miR-155-Expression. Die Autoren vermuten daher, dass der Weg, durch welchen die miR-155 die Apoptose induziert, in vielen soliden Tumoren und hämatologischen Malignomen defekt ist.[61] Eine weitere Studie zeigte jedoch ebenso, dass eine Überexpression der miR-155 auch in verschiedenen AML-Zelllinien zu einer Induktion der Apoptose führt. In HL-60-Zellen wurde dieser Zusammenhang ebenfalls gesehen. Dies bedeutet, dass die miR-155 auch in malignen Zellen einen tumorsuppressiven Effekt haben kann.[128] In der genannten Studie zeigte sich eine sehr schwache Induktion der Apoptose in HL-60. Die Unterschiede zu den hier dargestellten Versuchen sind am ehesten durch die Methode der Transfektion zu erklären. Durch die Methode der Elektroporation kommt es zu einer starken Zunahme apoptotischer und nekrotischer Zellen. Eine geringe Zunahme der Apoptose als Wirkung der miR-155-Überexpression wurde in den hier dargestellten Versuchen vermutlich maskiert.

#### 4.5. Einfluss der miR-155 auf den PI3K/Akt-Signalweg

Das Protein SHIP1 ist eine 5-Phosphatase, deren Substrat die Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat ist. Es ist spezifisch für hämatopoetische Zellen.[129, 130] Es wurde gezeigt, dass SHIP1 ein negativer Regulator des PI3K/Akt-Signalweges und ein Zielgen der miR-155 ist.[79, 92, 110, 131] Der Verlust der Phosphatase SHIP1 mit der daraus resultierenden Dysregulation des PI3K/Akt-Signalweges scheint bei der Genese akuter Leukämien aus MDS eine Rolle zu spielen. Dieser Verlust wird überwiegend durch den Einfluss zweier miRNAs (miR-155 und miR-210) verursacht. Auch wenn eine Unterscheidung der primären gegenüber den aus einem MDS hervorgegangenen akuten Leukämien anhand der miR-155 nicht gelang, so schließt dies den Zusammenhang zwischen SHIP1-Inhibition und Progression des MDS nicht aus. Möglicherweise steht bei der Inhibition von SHIP1 während der Progression der MDS die miR-210 im Vordergrund.[132]

Es sollte nun untersucht werden, ob eine Überexpression der miR-155 in Zellen mit endogen niedriger Expression ebenfalls zu einer Abnahme des Proteins SHIP1 führt. Außerdem sollte der Einfluss auf nachgeschaltete Proteine des PI3K/Akt-Signalweges untersucht werden. Die Ergebnisse des Versuches zeigten, dass eine Überexpression der miR-155 zu einer Abnahme des SHIP1 in RS4;11-Zellen nach 48 h führte. Ein ähnlicher Effekt konnte in einer Mikroglia-Zelllinie ebenfalls beobachtet werden. Außerdem konnte ein Effekt einer erhöhten miR-155-Expression auf die Konzentration der mRNA gezeigt werden, was für eine Inhibition durch Degradation der mRNA spricht.[124] Doch auch durch SHIP1 regulierte Proteine werden beeinflusst. Während die gesamte Menge des Proteins Akt auf gleich hohem Niveau bleibt, steigt die Menge des phosphorylierten Akts deutlich an, was für eine höhere Aktivität des Signalweges spricht. PTEN, ebenfalls ein negativer Regulator des PI3K/Akt-Signalweges, der jedoch nicht durch die miR-155 beeinflusst wird, bleibt unverändert. Ähnliche Ergebnisse werden durch die direkte Inhibition von SHIP1 erreicht. Der Verlust von SHIP1 mit der nachfolgenden Dysregulation des PI3K/Akt-Signalweges und auch der MAPK führt zu einer erhöhten Proliferation von erythroleukämischen Zellen.[133] Der Mechanismus, durch welchen die miR-155 die Expression von SHIP1 beeinflusst, kann durch die durchgeführten Versuche nicht untersucht werden. Da die mRNA des SHIP1-Gens nicht untersucht wurde, kann zwischen einer Translationshemmung bzw. Degradierung der mRNA nicht unterschieden werden. Die miR-155 beeinflusst ihre Zielgene sowohl durch Degradierung als auch durch Translationshemmung.[54] Die Zelllinie Jurkat zeichnet sich im Gegensatz zur Zelllinie RS4;11 durch eine Deletion der Proteine SHIP1 und PTEN aus. Eine Überexpression der miR-155 hat also keinen Effekt auf die Aktivität des Signalweges, da SHIP1 als Zielgen der miR-155 weg-

fällt. Da der Versuch zur Untersuchung des PI3K/Akt-Signalweges nur ein Mal durchgeführt wurde, kann daher nur ein Hinweis auf den Zusammenhang zwischen miR-155 und PI3K/Akt-Signalweg in akuten Leukämien geliefert werden. Weitere Versuche, die eine direkte Wirkung der miR-155 auf SHIP1 in akuten Leukämien belegen, sollten angestrebt werden.

#### 4.6. Sorafenib als effektives Medikament in akuten Leukämien

In klinischen Studien zeigte Sorafenib in Kombination mit einer Induktions-Chemotherapie eine sehr hohe Remissionsrate von 95 Prozent bei FLT3-ITD-positiven AML-Patienten in einer Phase II-Studie. Bei Patienten ohne FLT3-Mutation oder mit Mutation der transmembranalen Domäne waren die Remissionsraten etwas geringer (83 Prozent).[134] Einzelne Fallbeschreibungen suggerieren außerdem einen sinnvollen Einsatz des Medikamentes insbesondere vor allogener Stammzelltransplantation bei Patienten mit Kontraindikationen gegen eine Konsolidierungstherapie, als Erhaltungstherapie oder vor intensiver Induktions-Chemotherapie im Rezidiv.[135–137] Es konnte gezeigt werden, dass Sorafenib besonders bei AML-Patienten mit einer FLT-ITD-Mutation besonders im Rezidiv wirksam ist. Dies wird darauf zurückgeführt, dass im Rezidiv vermehrt Zellen mit vielen mutierten Allelen selektioniert wurden.[138] Auch der Einsatz als Vorphasetherapie bei Hyperleukozytose oder vor Einleitung einer Salvage-Chemotherapie bei Patienten mit FLT3-ITD-Mutation konnte das Ansprechen auf die Therapie steigern.[136] Ein Problem beim klinischen Einsatz von Multikinaseinhibitoren scheint außerdem die Entwicklung von sekundären Resistenzen zu sein. Dies erfolgt hauptsächlich durch erworbene Mutationen der transmembranalen Domäne bzw. deren Selektion im Zuge der medikamentösen Behandlung. Der Wechsel auf einen anderen Multikinaseinhibitor kann hier Erfolg versprechen. Sunitinib scheint auch bei Vorhandensein von Mutationen in der transmembranalen Domäne wirksam zu sein.[139]

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass der Multikinaseinhibitor Sorafenib deutliche antiproliferative Effekte in AML und ALL besitzt. Dies zeigt sich zum einen in der Abnahme der Zellzahl bzw. einer verlangsamten Proliferation gegenüber der Kontrolle als auch in einer verminderten metabolischen Aktivität verglichen mit der Kontrolle. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen kann von einer sicheren Hemmung der FLT3 ausgegangen werden.[138] Auch andere Multikinaseinhibitoren, wie beispielsweise SU11652, zeigen deutliche antiproliferative Effekte bei AML-Zelllinien. In der

Studie beschränkten sich die antiproliferativen Effekte jedoch auf Zellen, welche eine FLT3-ITD-Mutation aufweisen.[140] Dies steht im Widerspruch zu den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen. Eine antiproliferative Wirkung wurde auch bei SEM nachgewiesen, einer Zelllinie, welche keine FLT3-ITD-Mutation aufweist. Die diskrepanten Ergebnisse sind darauf zurückzuführen, dass Sorafenib ähnlich wie SU11652 auch andere Signaltransduktionswege beeinflusst. Eine Voraussage, ob eine Substanz einen antiproliferativen Effekt zeigt, ist daher nicht auf das Vorhandensein einer einzigen Mutation zurückzuführen.

Es konnte gezeigt werden, dass es unter der Inkubation der Zellen mit Sorafenib zu einer Induktion der Apoptose resultierend in einem Anstieg der apoptotischen und nekrotischen Zellen kommt. Eine Zunahme der apoptotischen und nekrotischen Zellen über den beobachteten Zeitraum wurde bei MV4-11-Zellen unter beiden untersuchten Konzentrationen beobachtet. Bei der Zelllinie SEM kam es jedoch nur unter der hohen Konzentration zu einem Anstieg der apoptotischen und nekrotischen Zellen. Da die Zelllinie SEM keine FLT3-Mutation aufweist, ist die pathologisch vermehrte Proliferation hier auf andere Stoffwechselprozesse zurückzuführen. Die Zelllinie MV4-11 ist jedoch bei konstitutiv erhöhter FLT3-Aktivität zum großen Teil auf diesen Mechanismus angewiesen. Sie reagiert daher sensibler auf die Anwesenheit von Sorafenib. Die Induktion der Apoptose in leukämischen Blasten erfolgt durch Spaltung der Caspasen 3 und 7 sowie dem Enzym PARP. Außerdem kommt es zu einem Zellzyklusarrest, welcher durch Verminderung der Aktivität der CDK4 und CyclinD3 zustande kommt.[141]

AML-Patienten, welche eine ITD-Mutation des Gens FLT3 aufwiesen, zeigten signifikant höhere Expressionswerte der miR-155 als Patienten ohne diese Mutation. Es sollte untersucht werden, ob die Expression der miR-155 durch Hemmung der FLT3-Tyrosinkinase verringert werden kann. Dazu wurden die Expressionswerte der miR-155 in den mit Sorafenib behandelten Zelllinien gemessen. Es zeigte sich, dass die Hemmung der FLT3-Aktivität keinen Einfluss auf die Expression der miR-155 besitzt. Die Werte zeigten in allen drei Ansätzen keine signifikanten Unterschiede. Dies unterstützt die Ergebnisse von Garzon et al., die zeigen konnten, dass eine Hemmung der FLT3 mit dem Inhibitor SU14813 ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression der miR-155 hat.[90] Interessanterweise zeigte sich in der Zelllinie SEM jedoch ein anderes Ergebnis. Diese Zelllinie besitzt keine Mutation des FLT3-Gens. Im Verlauf des Versuches nahm die Expression der miR-155 in dieser Zelllinie bei hoher Sorafenib-Konzentration jedoch auf nahezu das Doppelte der ursprünglichen Expression zu. Bei niedrigerer Konzentration blieb die Expression dagegen nahezu unverändert. Dies ist vermutlich

dadurch zu erklären, dass bei niedriger Sorafenib-Konzentration lediglich eine Wachstums-  
hemmung auftritt. Apoptose und Nekrose bleiben gegenüber der Kontrolle unverändert. Bei  
hoher Konzentration kommt es jedoch zu einer Induktion der Apoptose, was zu einer Abnah-  
me der Zellzahl führt. Möglicherweise haben Zellen, welche die miR-155 stärker exprimieren,  
hierbei einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Zellen, was im Verlauf zu einem Überwie-  
gen dieser Zellpopulation und damit einem scheinbaren Anstieg der miR-155-Expression  
führt.

## **5. Schlussfolgerung und Ausblick**

Diese Arbeit sollte zum Verständnis der Rolle der miR-155 in akuten Leukämien beitragen. Die durchgeführten Messungen und Experimente sollten zum einen die Expression der miR-155 in unterschiedlichen Leukämieformen untersuchen, um eine Assoziation mit bestimmten Subtypen zu erkennen und eine prognostische Bedeutung der miR-155 abzuschätzen. Zum anderen sollte der Einfluss der miR-155 auf Stoffwechselprozesse und Proliferationsverhalten der Zellen analysiert werden. Schließlich wurde der Einfluss des Multikinaseinhibitors Sorafenib auf die leukämischen Zellen untersucht.

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen eine differentielle Expression der miR-155 in verschiedenen akuten Leukämien. Ein Zusammenhang mit speziellen Subtypen der akuten Leukämien konnte gezeigt werden. Bereits publizierte Ergebnisse, welche einen Zusammenhang der miR-155-Expression mit bestimmten molekularbiologischen Markern sahen, konnten bestätigt werden. Jedoch war eine prognostische Aussage aus der Höhe der Expression nicht abzuleiten. Aufgrund des geringen Patientenkollektivs wäre jedoch eine Untersuchung an einer größeren Patientenzahl wünschenswert.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte kein Einfluss der miR-155 auf Proliferation oder Apoptoseinduktion in den leukämischen Zellen gezeigt werden. Jedoch konnte ein Einfluss auf den PI3K/Akt-Signalweg nachgewiesen werden. In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob die miR-155 auf die Chemosensibilität der Zelllinien einen Einfluss hat. Ein möglicher synergistischer Effekt einer miR-155-Inhibition oder miR-155-Überexpression auf die Chemosensibilität wäre denkbar.

Die Behandlung der Zelllinien mit dem Multikinaseinhibitor Sorafenib zeigte einen eindeutigen antileukämischen Effekt. In den untersuchten Zelllinien war der Effekt auf das Zellwachstum jedoch unterschiedlich. Die Identifizierung der Leukämiesubtypen, welche besonders sensibel auf Sorafenib ansprechen, wäre wünschenswert. Daher sollte in weiteren Untersuchungen Sorafenib an einer größeren Anzahl leukämischer Zelllinien getestet werden.

Die durchgeführten Versuche nutzten Methoden, die sehr arbeitsintensiv und zeitaufwändig waren. Neuere Methoden, wie das Next Generation Sequencing, haben die Arbeit mit miRNAs stark vereinfacht. Die Detektion mehrerer Sequenzen kann bei dieser Methode gleichzeitig erfolgen. Das Zusammenspiel der miRNAs untereinander kann dadurch wesentlich einfacher untersucht werden.

## 6. Literatur

- [1] Seydoux G, Mello CC, Pettitt J, Wood WB, Priess JR, Fire A. Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. *Nature* 1996;382:713–6.
- [2] Cogoni C, Macino G. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Current opinion in genetics & development* 2000;10:638–43.
- [3] Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem* 2010;79:351–79.
- [4] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19:92–105.
- [5] Ibáñez-Ventoso C, Vora M, Driscoll M. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS ONE* 2008;3:e2818.
- [6] Altuvia Y. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Research* 2005;33:2697–706.
- [7] Lee Y, Jeon K, Lee J, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002;21:4663–70.
- [8] Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkland SJ, Newman J et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 2008;132:875–86.
- [9] Calin GA. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004;101:2999–3004.
- [10] Wang D, Qiu C, Zhang H, Wang J, Cui Q, Yin Y. Human microRNA oncogenes and tumor suppressors show significantly different biological patterns: from functions to targets. *PLoS ONE* 2010;5.
- [11] Visone R, Croce CM. miRNAs and Cancer. *The American Journal of Pathology* 2009;174:1131–8.
- [12] Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009;10:704–14.
- [13] Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23:4051–60.
- [14] Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004;10:1957–66.
- [15] Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425:415–9.
- [16] Han J, Lee Y, Yeom K, Kim Y, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 2004;18:3016–27.
- [17] Luo X, Tsai LM, Shen N, Yu D. Evidence for microRNA-mediated regulation in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis* 2010;69 Suppl 1:i30-36.
- [18] Lund E. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* 2004;303:95–8.
- [19] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363–6.
- [20] Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001;293:834–8.
- [21] Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005;436:740–4.
- [22] Lee Y, Hur I, Park S, Kim Y, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 2006;25:522–32.



- [23] Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003;115:199–208.
- [24] Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003;115:209–16.
- [25] Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell* 2005;123:631–40.
- [26] Preall JB, Sontheimer EJ. RNAi: RISC gets loaded. *Cell* 2005;123:543–5.
- [27] Zhou H, Huang X, Cui H, Luo X, Tang Y, Chen S, Wu L et al. miR-155 and its star-form partner miR-155\* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2010;116:5885–94.
- [28] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010.
- [29] Azuma-Mukai A, Oguri H, Mituyama T, Qian ZR, Asai K, Siomi H, Siomi MC. Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2008;105:7964–9.
- [30] Pillai RS. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* 2004;10:1518–25.
- [31] Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat. Struct. Mol. Biol* 2008;15:346–53.
- [32] Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 2002;110:513–20.
- [33] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215–33.
- [34] Yekta S, Shih I, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 2004;304:594–6.
- [35] Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song J, Hammond SM et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004;305:1437–41.
- [36] Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR, Deutsch S, Elton TS, Hatzigeorgiou AG et al. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81:405–13.
- [37] Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev. Biol* 1999;216:671–80.
- [38] Seggerson K, Tang L, Moss EG. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene lin-28 after translation initiation. *Dev. Biol* 2002;243:215–25.
- [39] Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol* 2006;13:1108–14.
- [40] Petersen CP, Bordeleau M, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* 2006;21:533–42.
- [41] Pillai RS. Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells. *Science* 2005;309:1573–6.
- [42] MATHONNET G, FABIAN MR, SVITKIN YV, PARSYAN A, HUCK L, MURATA T, BIFFO S et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 2007;317:1764–7.
- [43] Humphreys DT. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005;102:16961–6.

- [44] Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005;433:769–73.
- [45] Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 2005;122:553–63.
- [46] Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2006;103:4034–9.
- [47] Eulalio A, Huntzinger E, Nishihara T, Rehwinkel J, Fauser M, Izaurralde E. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 2009;15:21–32.
- [48] Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, Myers JW, Herschlag D, Ferrell JE, Brown PO. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *Plos Biol* 2009;7:e1000238.
- [49] Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007;318:1931–4.
- [50] Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* 2008;30:460–71.
- [51] Tam W, Ben-Yehuda D, Hayward WS. bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukemia virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17:1490–502.
- [52] Eis PS. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005;102:3627–32.
- [53] Yin Q, Wang X, McBride J, Fewell C, Flemington E. B-cell Receptor Activation Induces BIC/miR-155 Expression through a Conserved AP-1 Element. *Journal of Biological Chemistry* 2007;283:2654–62.
- [54] Xiao B, Liu Z, Li B, Tang B, Li W, Guo G, Shi Y et al. Induction of microRNA -155 during *Helicobacter pylori* Infection and Its Negative Regulatory Role in the Inflammatory Response. *J INFECT DIS* 2009;200:916–25.
- [55] Kong W, Yang H, He L, Zhao J, Coppola D, Dalton WS, Cheng JQ. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol. Cell. Biol.* 2008;28:6773–84.
- [56] O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Boldin MP, Taganov KD, Nicoll J, Paquette RL et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *Journal of Experimental Medicine* 2008;205:585–94.
- [57] Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, Kohlhaas S, Das PP et al. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* 2007;27:847–59.
- [58] Thai T, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, Murphy A et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 2007;316:604–8.
- [59] Banerjee A, Schambach F, DeJong CS, Hammond SM, Reiner SL. Micro-RNA-155 inhibits IFN- $\gamma$  signaling in CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur. J. Immunol* 2010;40:225–31.
- [60] Ranganathan P, Heaphy CEA, Costinean S, Stauffer N, Na C, Hamadani M, Santhanam R et al. Regulation of acute graft-versus-host disease by microRNA-155. *Blood* 2012;119:4786–97.
- [61] Lu C, Huang X, Zhang X, Roensch K, Cao Q, Nakayama KI, Blazar BR et al. miR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis, and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1, and SOCS-1. *Blood* 2011;117:4293–303.
- [62] Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, Barras E, Reith W, Santos MA, Pierre P. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009;106:2735–40.

- [63] Chen J, Wang B, Tang J. Clinical significance of MicoRNA-155 expression in human breast cancer. *J Surg Oncol* 2012;106:260–6.
- [64] Wang X, Tang S, Le S, Lu R, Rader JS, Meyers C, Zheng Z. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS ONE* 2008;3:e2557.
- [65] Zheng D, Haddadin S, Wang Y, Gu L, Perry MC, Freter CE, Wang MX. Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2011;4:575–86.
- [66] Merkerova M, Belickova M, Bruchova H. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur. J. Haematol.* 2008;81:304–10.
- [67] Hu Y, Fong S, Largman C, Shen W. HOXA9 regulates miR-155 in hematopoietic cells. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:5472–8.
- [68] van den Berg A, Kroesen B, Kooistra K, Jong D de, Briggs J, Blokzijl T, Jacobs S et al. High expression of B-cell receptor inducible geneBIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosom. Cancer* 2003;37:20–8.
- [69] Kluiver J, Poppema S, Jong D de, Blokzijl T, Harms G, Jacobs S, Kroesen B et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J. Pathol.* 2005;207:243–9.
- [70] Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T, Cooper CDO, Palazzo S, Paterson JC, Cattan H et al. MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int. J. Cancer* 2007;121:1156–61.
- [71] Kluiver J, Haralambieva E, Jong D de, Blokzijl T, Jacobs S, Kroesen B, Poppema S et al. Lack ofBIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma. *Genes Chromosom. Cancer* 2006;45:147–53.
- [72] Kluiver J, van den Berg A, Jong D de, Blokzijl T, Harms G, Bouwman E, Jacobs S et al. Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma. *Oncogene* 2007;26:3769–76.
- [73] Wang M, Tan LP, Dijkstra MK, van Lom K, Robertus J, Harms G, Blokzijl T et al. miRNA analysis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: proliferation centres characterized by low miR-150 and high BIC/miR-155 expression. *J. Pathol.* 2008;215:13–20.
- [74] Marton S, Garcia MR, Robello C, Persson H, Trajtenberg F, Pritsch O, Rovira C et al. Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis. *Leukemia* 2008;22:330–8.
- [75] Gibcus JH, Tan LP, Harms G, Schakel RN, Jong D de, Blokzijl T, Möller P et al. Hodgkin lymphoma cell lines are characterized by a specific miRNA expression profile. *Neoplasia* 2009;11:167–76.
- [76] Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, Azzalin G, Carucci N, Tavoraro S, Castellano L et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007;109:4944–51.
- [77] Costinean S. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E -miR155 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006;103:7024–9.
- [78] O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009;106:7113–8.
- [79] Cremer TJ, Ravneberg DH, Clay CD, Piper-Hunter MG, Marsh CB, Elton TS, Gunn JS et al. miR-155 Induction by F. novicida but Not the Virulent F. tularensis Results in SHIP Down-Regulation and Enhanced Pro-Inflammatory Cytokine Response. *PLoS ONE* 2009;4:e8508.

- 
- [80] Jiang S, Zhang HW, Lu MH, He XH, Li Y, Gu H, Liu MF et al. MicroRNA-155 Functions as an OncomiR in Breast Cancer by Targeting the Suppressor of Cytokine Signaling 1 Gene. *Cancer Research* 2010;70:3119–27.
  - [81] Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang X, Bannon F et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet* 2015;385:977–1010.
  - [82] Löwenberg B, Pabst T, Vellenga E, van Putten W, Schouten HC, Graux C, Ferrant A et al. Cytarabine dose for acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med* 2011;364:1027–36.
  - [83] Walter RB, Pagel JM, Gooley TA, Petersdorf EW, Sorror ML, Woolfrey AE, Hansen JA et al. Comparison of matched unrelated and matched related donor myeloablative hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia in first remission. *Leukemia* 2010;24:1276–82.
  - [84] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114:937–51.
  - [85] Hoelzer D, Arnold R, Bartram CR, Böhme A, Freund M, Ganser A, Kneba M et al. Akute lymphatische Leukämie des Erwachsenen. Diagnostik, Risikogruppen und Therapie. *Der Internist* 2002;43:1212–6, 1219–22, 1224–7.
  - [86] Rowe JM. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology* 2010:no.
  - [87] Grimwade D, Hills RK. Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:385–95.
  - [88] Livak K. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 2001;25:402–8.
  - [89] Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e36.
  - [90] Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, Briesewitz R, Wang L, Fernandez-Cymering C, Volinia S et al. Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105:3945–50.
  - [91] Kong W, He L, Coppola M, Guo J, Esposito NN, Coppola D, Cheng JQ. MicroRNA-155 Regulates Cell Survival, Growth, and Chemosensitivity by Targeting FOXO3a in Breast Cancer. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285:17869–79.
  - [92] Costinean S, Sandhu SK, Pedersen IM, Tili E, Trotta R, Perrotti D, Ciarlariello D et al. Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein are targeted by miR-155 in B cells of E-miR-155 transgenic mice. *Blood* 2009;114:1374–82.
  - [93] Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004;64:7099–109.
  - [94] Cammarata G, Augugliaro L, Salemi D, Agueli C, La Rosa M, Dagnino L, Civiletto G et al. Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia. *Am. J. Hematol* 2010:NA.
  - [95] Whitman SP, Maharry K, Radmacher MD, Becker H, Mrózek K, Margeson D, Holland KB et al. FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary

- cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 2010;116:3622–6.
- [96] Chen A, Luo M, Yuan G, Yu J, Deng T, Zhang L, Zhou Y et al. Complementary analysis of microRNA and mRNA expression during phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)-induced differentiation of HL-60 cells. *Biotechnol. Lett.* 2008;30:2045–52.
- [97] Forrest ARR, Kanamori-Katayama M, Tomaru Y, Lassmann T, Ninomiya N, Takahashi Y, Hoon MJL de et al. Induction of microRNAs, miR-155, miR-222, miR-424 and miR-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation. *Leukemia* 2009;24:460–6.
- [98] Matsumoto E, Hatanaka M, Bohgaki M, Maeda S. PKC pathway and ERK/MAPK pathway are required for induction of cyclin D1 and p21Waf1 during 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced differentiation of myeloleukemia cells. *Kobe J Med Sci* 2006;52:181–94.
- [99] Tam W, Hughes SH, Hayward WS, Besmer P. Avian bic, a gene isolated from a common retroviral site in avian leukosis virus-induced lymphomas that encodes a noncoding RNA, cooperates with c-myc in lymphomagenesis and erythroleukemogenesis. *J. Virol.* 2002;76:4275–86.
- [100] Bolisetty MT, Dy G, Tam W, Beemon KL. Reticuloendotheliosis Virus Strain T Induces miR-155, Which Targets JARID2 and Promotes Cell Survival. *Journal of Virology* 2009;83:12009–17.
- [101] Dorsett Y, McBride KM, Jankovic M, Gazumyan A, Thai T, Robbiani DF, Di Virgilio M et al. MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity* 2008;28:630–8.
- [102] Gatto G, Rossi A, Rossi D, Kroening S, Bonatti S, Mallardo M. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 trans-activates miR-155 transcription through the NF- B pathway. *Nucleic Acids Research* 2008;36:6608–19.
- [103] Lu F, Weidmer A, Liu C, Volinia S, Croce CM, Lieberman PM. Epstein-Barr Virus-Induced miR-155 Attenuates NF- B Signaling and Stabilizes Latent Virus Persistence. *Journal of Virology* 2008;82:10436–43.
- [104] Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, Frenzel C, Majoros WH, Chi JA, Braich R et al. A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* 2007;450:1096–9.
- [105] Zhang T, Nie K, Tam W. BIC is processed efficiently to microRNA-155 in Burkitt lymphoma cells. *Leukemia* 2008;22:1795–7.
- [106] Rai D, Karanti S, Jung I, Dahia PLM, Aguiar RCT. Coordinated expression of microRNA-155 and predicted target genes in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2008;181:8–15.
- [107] Zhu Y, Wang L, Sun C, Fan L, Zhu D, Fang C, Wang Y et al. Distinctive microRNA signature is associated with the diagnosis and prognosis of acute leukemia. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 2011.
- [108] Chuang M, Chiu Y, Chou W, Hou H, Chuang EY, Tien H. A 3-microRNA scoring system for prognostication in de novo acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2015;29:1051–9.
- [109] Marcucci G, Maharry KS, Metzeler KH, Volinia S, Wu Y, Mrózek K, Nicolet D et al. Clinical role of microRNAs in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: miR-155 upregulation independently identifies high-risk patients. *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013;31:2086–93.
- [110] Pedersen IM, Otero D, Kao E, Miletic AV, Hother C, Ralfkiaer E, Rickert RC et al. Onco-miR-155 targets SHIP1 to promote TNF $\alpha$ -dependent growth of B cell lymphomas. *EMBO Mol Med* 2009;1:288–95.

- [111] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2008;141:672–5.
- [112] Wang F, Hou J, Jin W, Li J, Yue Y, Jin H, Wang X. Increased Circulating MicroRNA-155 as a Potential Biomarker for Breast Cancer Screening: A Meta-Analysis. *Molecules* 2014;19:6282–93.
- [113] Chauhan PS, Ihsan R, Singh LC, Gupta DK, Mittal V, Kapur S. Mutation of NPM1 and FLT3 Genes in Acute Myeloid Leukemia and Their Association with Clinical and Immunophenotypic Features. *Dis. Markers* 2013;35:581–8.
- [114] Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999;93:3074–80.
- [115] Schneider F, Hoster E, Unterhalt M, Schneider S, Dufour A, Benthous T, Mellert G et al. The FLT3ITD mRNA level has a high prognostic impact in NPM1 mutated, but not in NPM1 unmutated, AML with a normal karyotype. *Blood* 2012;119:4383–6.
- [116] Yoshimoto G, Miyamoto T, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Iino T, Rocnik JL, Kikushige Y, Mori Y et al. FLT3-ITD up-regulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation. *Blood* 2009;114:5034–43.
- [117] Breitenbuecher F, Schnittger S, Grundler R, Markova B, Carius B, Brecht A, Duyster J et al. Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Blood* 2009;113:4074–7.
- [118] Faraoni I, Laterza S, Ardiri D, Ciardi C, Fazi F, Lo-Coco F. miR-424 and miR-155 deregulated expression in cytogenetically normal acute myeloid leukaemia: correlation with NPM1 and FLT3 mutation status. *J Hematol Oncol* 2012;5:26.
- [119] Kok CH, Brown AL, Perugini M, Iarossi DG, Lewis ID, D'Andrea RJ. The preferential occurrence of FLT3-TKD mutations in inv(16) AML and impact on survival outcome: a combined analysis of 1053 core-binding factor AML patients. *Br. J. Haematol.* 2013;160:557–9.
- [120] Krzeminski P, Sarasquete ME, Misiewicz-Krzeminska I, Corral R, Corchete LA, Martín AA, García-Sanz R et al. Insights into epigenetic regulation of microRNA-155 expression in multiple myeloma. *Biochimica et biophysica acta* 2015;1849:353–66.
- [121] Fabani MM, Abreu-Goodger C, Williams D, Lyons PA, Torres AG, Smith KGC, Enright AJ et al. Efficient inhibition of miR-155 function in vivo by peptide nucleic acids. *Nucleic Acids Research* 2010;38:4466–75.
- [122] Lu Y, Xiao J, Lin H, Bai Y, Luo X, Wang Z, Yang B. A single anti-microRNA antisense oligodeoxynucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:e24.
- [123] Hogan DJ, Vincent TM, Fish S, Marcusson EG, Bhat B, Chau BN, Zisoulis DG. Anti-miRs competitively inhibit microRNAs in Argonaute complexes. *PloS one* 2014;9:e100951.
- [124] Thounaojam MC, Kundu K, Kaushik DK, Swaroop S, Mahadevan A, Shankar SK, Basu A. MicroRNA 155 Regulates Japanese Encephalitis Virus-Induced Inflammatory Response by Targeting Src Homology 2-Containing Inositol Phosphatase 1. *Journal of Virology* 2014;88:4798–810.
- [125] Alizadeh S, Kaviani S, Soleimani M, Abroun S, Kashani-Khatib Z, Asgharzadeh A, Dargahi H et al. miR-55 inhibition can reduce cell proliferation and induce apoptosis in Jurkat (Acute T cell Leukemia) cell line. *Iranian journal of pediatric hematology and oncology* 2014;4:141–50.
- [126] Lv H, Guo J, Li S, Jiang D. miR-155 inhibitor reduces the proliferation and migration in osteosarcoma MG-63 cells. *Exp Ther Med* 2014.

- [127] Willimott S, Wagner SD. miR-125b and miR-155 contribute to BCL2 repression and proliferation in response to CD40 ligand (CD154) in human leukemic B-cells. *J. Biol. Chem.* 2012;287:2608–17.
- [128] Palma CA, Al Sheikha D, Lim TK, Bryant A, Vu TT, Jayaswal V, Ma, David D F. MicroRNA-155 as an inducer of apoptosis and cell differentiation in Acute Myeloid Leukaemia. *Molecular cancer* 2014;13:79.
- [129] Lioubin MN, Algate PA, Tsai S, Carlberg K, Aebersold A, Rohrschneider LR. p150Ship, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity. *Genes Dev.* 1996;10:1084–95.
- [130] Damen JE, Liu L, Rosten P, Humphries RK, Jefferson AB, Majerus PW, Krystal G. The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetraphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93:1689–93.
- [131] McCoy CE, Sheedy FJ, Qualls JE, Doyle SL, Quinn SR, Murray PJ, O'Neill LAJ. IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors. *J. Biol. Chem* 2010;285:20492–8.
- [132] Lee DW, Futami M, Carroll M, Feng Y, Wang Z, Fernandez M, Whichard Z et al. Loss of SHIP-1 protein expression in high-risk myelodysplastic syndromes is associated with miR-210 and miR-155. *Oncogene* 2012;31:4085–94.
- [133] Lakhanpal GK, Vecchiarelli-Federico LM, Li Y, Cui J, Bailey ML, Spaner DE, Dumont DJ et al. The inositol phosphatase SHIP-1 is negatively regulated by Fli-1 and its loss accelerates leukemogenesis. *Blood* 2010;116:428–36.
- [134] Ravandi F, Arana Yi C, Cortes JE, Levis M, Faderl S, Garcia-Manero G, Jabbour E et al. Final report of phase II study of sorafenib, cytarabine and idarubicin for initial therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2014;28:1543–5.
- [135] Sammons SL, Pratz KW, Smith BD, Karp JE, Emadi A. Sorafenib is tolerable and improves clinical outcomes in patients with FLT3-ITD acute myeloid leukemia prior to stem cell transplant and after relapse post-transplant. *Am. J. Hematol.* 2014;89: 936–8.
- [136] Cummins KD, Jane SM, Nikovic S, Bazargan A, Filshie R, Suttrave G, Hertzberg M et al. Sorafenib priming may augment salvage chemotherapy in relapsed and refractory FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* 2014;4:e237.
- [137] Antar A, Kharfan-Dabaja MA, Mahfouz R, Bazarbachi A. Sorafenib Maintenance Appears Safe and Improves Clinical Outcomes in FLT3-ITD Acute Myeloid Leukemia After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* 2015;15:298–302.
- [138] Pratz KW, Sato T, Murphy KM, Stine A, Rajkhowa T, Levis M. FLT3-mutant allelic burden and clinical status are predictive of response to FLT3 inhibitors in AML. *Blood* 2010;115:1425–32.
- [139] Baker SD, Zimmerman EI, Wang Y, Orwick S, Zatechka DS, Buaboonnam J, Neale GA et al. Emergence of polyclonal FLT3 tyrosine kinase domain mutations during sequential therapy with sorafenib and sunitinib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2013;19:5758–68.
- [140] Guo Y, Chen Y, Xu X, Fu X, Zhao ZJ. SU11652 Inhibits tyrosine kinase activity of FLT3 and growth of MV-4-11 cells. *J Hematol Oncol* 2012;5:72.
- [141] Schult C, Dahlhaus M, Ruck S, Sawitzky M, Amoroso F, Lange S, Etro D et al. The multikinase inhibitor Sorafenib displays significant antiproliferative effects and induces apoptosis via caspase 3, 7 and PARP in B- and T-lymphoblastic cells. *BMC cancer* 2010;10:560.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biogenese der miRNAs.....	3
Abbildung 2: Bindungsstelle der miR-155 mit der mRNA von SHIP1[79] .....	9
Abbildung 3: Zellpopulationen nach Dichtezentrifugation mit Biocoll.....	25
Abbildung 4:Auswertung der Apoptose- und Nekroseraten .....	30
Abbildung 5: Korrelation der Ct-Werte von zwei unabhängigen Versuchen .....	41
Abbildung 6: Korrelation der Ct-Werte von zwei unabhängigen Versuchen .....	42
Abbildung 7: Relative Expression der miR-155 in akuten Leukämien und gesunden Zellen.....	43
Abbildung 8: Relative Expression der pri-miR-155 BIC in akuten Leukämien .....	45
Abbildung 9: Effizienz der miR-155-Prozessierung in akuten Leukämien .....	46
Abbildung 10: Expression der miR-155 in de novo-Zellen .....	48
Abbildung 11: Überlebensdiagramm der AML-Patienten .....	50
Abbildung 12: Einfluss der FLT3-ITD-Mutation auf die Expression der miR-155 .....	51
Abbildung 13: Einfluss der NPM1-Mutation auf die Expression der miR-155.....	52
Abbildung 14: Expression der miR-155 in FAB-Subtypen .....	53
Abbildung 15: Transfektionseffizienz der Zelllinien SEM und MV4-11 .....	55
Abbildung 16: Inhibition der Expression der miR-155.....	56
Abbildung 17: Einfluss der Hemmung der miR-155 auf die Proliferation der Zelllinien .	57
Abbildung 18: Einfluss der miR-155-Inhibition auf die metabolische Aktivität.....	59
Abbildung 19: Einfluss der Inhibition der miR-155 auf Apoptose und Nekrose.....	60
Abbildung 20: Transfektionseffizienz der Zelllinien RS4;11, Jurkat und HL60.....	61
Abbildung 21: Überexpression der miR-155 in den untersuchten Zelllinien .....	63
Abbildung 22: Einfluss der Überexpression der miR-155 auf die Zellproliferation.....	64
Abbildung 23: Einfluss der Überexpression der miR-155 auf die metabolische Aktivität	65
Abbildung 24: Apoptose- und Nekroseraten nach Überexpression der miR-155.....	66
Abbildung 25: Expression von Proteinen des PI3K/Akt-Signalweges .....	67
Abbildung 26: Zellproliferation in Abhängigkeit von der Behandlung mit Sorafenib .....	69
Abbildung 27: Metabolische Aktivität der mit Sorafenib behandelten Zellen .....	70
Abbildung 28: Apoptose- und Nekroseraten unter der Behandlung mit Sorafenib .....	72
Abbildung 29: Expression der miR-155 unter dem Einfluss von Sorafenib.....	73
Abbildung 30: Durchflusszytometrische Messung der Apoptose und Nekrose .....	XV



## 8. **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: ALL-Subtypen[85] .....	11
Tabelle 2: Zytogenetische Risikofaktoren nach Rowe[86] .....	12
Tabelle 3: FAB-Klassifikation der AML .....	13
Tabelle 4: WHO-Klassifikation der AML[84] .....	13
Tabelle 5: Risikogruppen nach Grimwade und Hills[87] .....	14
Tabelle 6: Verwendete Zelllinien, Zelltyp und Kulturbedingungen .....	22
Tabelle 7: Transfektionsansatz .....	28
Tabelle 8: Pipettierschema des Master-Mixes für die RT kleiner RNAs .....	32
Tabelle 9: Pipettierschema des Master-Mixes für die RT der mRNA .....	33
Tabelle 10: Pipettierschema des Master-Mixes für die qPCR der miRNAs .....	34
Tabelle 11: Programmeinstellung der qPCR .....	35
Tabelle 12: Pipettierschema des Master-Mixes für die qPCR von BIC .....	35
Tabelle 13: Reaktionsbedingungen der qPCR .....	36
Tabelle 14: Verwendete Antikörper .....	38
Tabelle 15: Anreicherung hämatopoetischer Stammzellen .....	42
Tabelle 16: Angaben zu den verwendeten Zelllinien .....	I
Tabelle 17: Patientencharakteristika .....	II
Tabelle 18: Expression der miR-155 nach Hemmung mittels ASO .....	V
Tabelle 19: Zellzahl nach Inhibition mit ASO .....	VI
Tabelle 20: Metabolische Aktivität nach Inhibition mit ASO .....	VI
Tabelle 21: Apoptoserate nach Inhibition mit ASO .....	VII
Tabelle 22: Nekroserate nach Inhibition mit ASO .....	VII
Tabelle 23: Expression der miR-155 nach Überexpression .....	VIII
Tabelle 24: Zellzahl nach Überexpression .....	IX
Tabelle 25: Metabolische Aktivität nach Überexpression .....	X
Tabelle 26: Apoptoserate nach Überexpression .....	XI
Tabelle 27: Nekroserate nach Überexpression .....	XII
Tabelle 28: Zellzahl unter Sorafenib .....	XIII
Tabelle 29: Metabolische Aktivität unter Sorafenib .....	XIII
Tabelle 30: Apoptoserate unter Sorafenib .....	XIV
Tabelle 31: Nekroserate unter Sorafenib .....	XIV
Tabelle 32: Expression unter Sorafenib .....	XVI

## 9. Anhang

**Tabelle 16: Angaben zu den verwendeten Zelllinien**

Name	Typ	Generiert aus	Zytogenetik	miR-155		BIC	
				Expression	p-Wert	Expression	p-Wert
REH	Vorläufer-B-ALL	pB von 15-jährigem Mädchen im Rezidiv	human pseudodiploid karyotype - 46(44-47)<2n>X, -X, +16, del(3)(p22), t(4;12;21;16)(q32;p13;q22;q24.3)-inv(12)(p13q22), t(5;12)(q31-q32;p12), der(16)t(16;21)(q24.3;q22) - sideline with inv(5)der(5)(p15q31),+18	0,68	0,02	0,49	0,01
SEM	Vorläufer-B-ALL	pB von 5-jährigem Mädchen im Rezidiv	human hypodiploid karyotype with 1.5% polyploidy - 45(40-46)<2n>XX, -13, t(4;11)(q21;q23), del(7)(p14)	1,70	0,00	4,69	0,00
RS4;11	Vorläufer-B-ALL	KM von 32-jähriger Frau im Rezidiv	human hyperdiploid karyotype - 47/48<2n>X/XX, +8, +18, t(4;11)(q21;q23), i(7q) - sideline without +8/18	0,66	0,02	0,65	0,15
MOLT-4	T-ALL	pB von 19-jährigem Mann im Rezidiv	human flat-moded hypertetraploid karyotype - 89-99<4n>XXYY, +4, +7, +8, +20, +20, del(6)(q16)x2, der(7)t(7;7)(p15;q11)x2	0,25	0,00	0,25	0,00
Jurkat	T-ALL	pB von 14-jährigem Jungen im Rezidiv	human flat-moded hypotetraploid karyotype with 7.8% polyploidy - 87(78-91)<4n>XX, -Y, -Y, -5, -16, -17, -22, add(2)(p21)/del(2)(p23)x2 - sideline with additional der(5)t(5;10)(q11;p15), del(9)(p11)	0,47	0,00	0,30	0,01
HL60	AML M2	pB von 35-jähriger Frau	human flat-moded hypotetraploid karyotype with hypodiploid sideline and 1.5% polyploidy - 82-88<4n>XX, -X, -X, -8, -8, -16, -17, -17, +18, +22, +2mar, ins(1;8)(p?31;q24hsr)x2, der(5)t(5;17)(q11;q11)x2, add(6)(q27)x2, der(9)del(9)(p13)t(9;14)(q?22;q?22)x2, der(14)t(9;14)(q?22;q?22)x2, der(16)t(16;17)(q22;q22)x1-2, add(18)(q21) - sideline with: -2, -5, -15, del(11)(q23.1q23.2)	0,46	0,00	0,29	0,02
MV4-11	AML M5	Von 10-jährigem Jungen	human hyperdiploid karyotype - 48(46-48)<2n>XY, +8, +18, +19, -21, t(4;11)(q21;q23)	2,32	0,00	5,00	0,01
NB4	AML M3	KM von 23-jähriger Frau im zweiten Rezidiv	human hypertriploid karyotype with 3% polyploidy - 78(71-81)<3n>XX, -X, +2, +6, +7, +7, +11, +12, +13, +14, +17, -19, +20, +4mar, der(8)t(8;?)(q24;?), der(11)t(11;?)(?>::11p15->11q22.1::11q13->22.1.), der(12)t(12;?)(p11;?), 14p+, t(15;17)(q22;q11-12.1), der(19)t(10;19)(q21.1;p13.3)x2	0,93	0,75	0,98	0,95
DogKIT	Burkitt-Lymphom	pB von 56-jährigem Mann im zweiten Rezidiv	human flat-moded hyperdiploid karyotype with 3.5% polyploidy; 46-49<2n>XY, +20, dup(1)(q21q42), der(2)t(2;14)(q37;q24)t(14;18)(q32;q21), t(8;22)(q24;q11.2), der(14)t(X;14)(p21;p13)t(14;18)(q32;q21), dup(17)(q11q22), der(18)t(14;18)(q32;q21); supernumerary acf/dm present at 14%; sdl with add(16)(p13)	0,02	0,00	0,01	0,00
DoGum	Burkitt-Lymphom	Pleuraerguss von 49-jährigem Mann	highly rearranged human hypodiploid karyotype with 6% polyploidy; 43(40-45)<2n>X, -X, -14, -15, der(1)t(1;14)(q32;q21.2), t(14;18)(q32;q21), t(2;8)(q14;q24), der(2)t(2;8), dup(4)(p12p15), add(5)(q13), add(6)(p23), der(6;17)(p1?0;q1?0), add(10)(p12), del(12)(q21), inv(13)(p12q21), der(15)t(5;15)(q14;q21), add(15)(p11)add(15)(q2?), der(18)t(14;18)(q32;q21), add(22)(p11), +2mar	0,32	0,00	0,52	0,03
GumBus	Burkitt-Lymphom	Liquor cerebrospinalis von 28-jährigem Mann	human near diploid karyotype with 4% polyploidy 46(44-46)<2n>,XY, del(3)(p11p21.2), del(6)(q14q24), t(8;14)(q24;q32)	0,46	0,05	2,44	0,01

Relative Expression im Vergleich zu gesunden HSZ, Signifikanzniveau im Vergleich zu HSZ

Tabelle 17: Patientencharakteristika

Nr.	Diagnose	Karyotyp	FLT3	NPM1	MDS	Krankheitsstadium	Alter bei Diagnose [Jahre]	Therapieansatz	Überlebenszeit [Tage]	miR-155	
										Expr.	p-Wert
1	AML n.d.	46,XY,dic(1;22)(q10;q10)	n.d.	n.d.	nein	rezidiert	54	palliativ	112†	1,82	0,00
2	AML n.d.	46,XX	neg.	neg.	nein	initial	73	kurativ	240	0,26	0,00
3	AML M2	46,XX	neg.	neg.	nein	initial	55	kurativ	248†	0,34	0,02
4	AML M5	46,XX	neg.	pos.	nein	initial	66	kurativ	1393	0,38	0,02
5	AML n.d.	45,X,del(20q)	n.d.	n.d.	nein	initial	62	kurativ	1736	0,94	0,58
6	AML M1	47,XY,+13	n.d.	n.d.	ja	initial	70	palliativ	79†	1,02	0,80
7	AML M3	46,XX,t(15;17)(q22;q21), nuc ish(PMLx2),(RARAx2), (PMLconRARAx2)	n.d.	n.d.	nein	initial	51	kurativ	33†	0,20	0,04
8	AML M2	45,XY,-7	n.d.	n.d.	ja	initial	65	palliativ	44†	0,33	0,05
9	AML M4	46,XX,t(1;21)(q21;q22)[9],ish t(1;21)	n.d.	n.d.	nein	rezidiert	51	kurativ	2010	0,33	0,02
10	AML n.d.	44,XX,del(5)(q13q33),-7, t(15;17)(pter;q11),-17, der(21)t(1;21)(p11;pter)[1] /idem r(12)(?)[5]/43,XX,del(5)(q13q33),-7,-12, t(12;14)(q11;pter),t(15;17) (pter;q11),-17, der(21)t(1;21)(p11;pter)[3]	neg.	pos.	ja	initial	72	kurativ	570†	0,45	0,00
11	AML n.d.	komplex aberrant	neg.	neg.	nein	initial	66	kurativ	255	0,28	0,03
12	AML M2	47,XY,+8	pos.	neg.	ja	initial	70	kurativ	181†	1,22	0,03
13	AML M0	46,XY	neg.	neg.	nein	initial	66	palliativ	94†	0,44	0,13
14	AML M0	46,XY	neg.	neg.	nein	initial	64	kurativ	1399	0,46	0,00
15	AML M7	45-47,X,-X,t(1;?)(p;?),-2, t(3;?)(p24;?),add(4)(qter),-5, del(6)(q21q26),add(6)(qter),del(7)(q?21q22,q?32q35),- 8,der(12)t(8;12)(q13;p?13)	neg.	neg.	nein	rezidiert	56	kurativ	938†	0,42	0,02
16	AML M5	46,XX	n.d.	n.d.	nein	initial	84	palliativ	2†	0,20	0,00
17	AML n.d.	46,XX	neg.	neg.	ja	initial	71	kurativ	161†	0,24	0,03
18	AML n.d.	46,XX	neg.	pos.	nein	initial	73	palliativ	7†	0,42	0,04
19	AML M1	45,XX,del(2)(p1?5),-3,del(5)(q13q33), der(7)t(7;8)(p11;q10),i(8)(q10),t(12;?)(p11;?)[2]/45,XX,id em,-7,+i(8)(q10)	neg.	neg.	ja	initial	75	palliativ	150†	0,30	0,00
20	AML M1	47,XX,+21	neg.	pos.	nein	initial	66	kurativ	1232	0,87	0,06
21	AML M5b	46,XX,t(4;11)(q21;q23)	neg.	neg.	nein	initial	67	palliativ	2†	0,38	0,04
22	AML M1	46,XY	n.d.	n.d.	nein	initial	69	palliativ	19†	0,31	0,00
23	AML M4	46,XY	pos.	neg.	nein	initial	72	palliativ	76†	1,17	0,12
24	AML n.d.	46,XX	neg.	neg.	nein	initial	79	palliativ	76†	0,55	0,02
25	AML M4	46,XY	neg.	pos.	nein	initial	53	kurativ	151	0,94	0,40
26	AML M4	45,XY,-7	neg.	neg.	nein	initial	73	kurativ	524†	0,38	0,04
f	AML M0	46,XX	neg.	neg.	nein	initial	46	kurativ	427	0,45	0,00
28	AML M1	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22),-Y,del(9q)	n.d.	neg.	nein	initial	45	kurativ	151	0,44	0,00
29	AML n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	ja	initial	78	palliativ	24	0,68	0,02

Nr.	Diagnose	Karyotyp	FLT3	NPM1	MDS	Krankheits- stadium	Alter bei Diagnose [Jahre]	Therapie- ansatz	Überlebenszeit [Tage]	miR-155	
										Expr.	p-Wert
30	AML M5	46,XY	n.d.	n.d.	nein	initial	49	kurativ	395†	0,11	0,00
31	AML M4/M5	46,XX	n.d.	n.d.	nein	initial	61	kurativ	127	0,25	0,00
32	AML n.d.	49,XY,+8,del(13)(q12q14),+del(13)(q12q14)x2, nuc ish(D13S319x1~2,LAMP1x3~4)[97/100]	n.d.	n.d.	nein	initial	21	kurativ	14†	0,40	0,00
33	AML M5b	46,XY	neg.	neg.	ja	rezidiert	52	kurativ	3968	0,20	0,00
34	AML M4	46,XX	neg.	neg.	nein	initial	57	kurativ	125	0,54	0,00
35	AML n.d.	46,XX	neg.	neg.	nein	initial	75	kurativ	684	0,30	0,00
36	AML M7	46,XY	neg.	neg.	ja	initial	66	kurativ	613	0,09	0,00
37	AML n.d.	46,XY	n.d.	pos.	ja	initial	73	kurativ	612	0,11	0,00
38	AML M1	45,XX,-7	n.d.	n.d.	nein	initial	73	palliativ	329†	0,07	0,00
39	AML M4	46,XX	pos.	neg.	nein	initial	54	kurativ	236	0,22	0,02
40	AML M3	46,XY,t(15;17)(q22;q21.1)	n.d.	n.d.	nein	initial	63	kurativ	460	0,20	0,02
41	AML M4	46,XY	n.d.	n.d.	nein	initial	85	palliativ	117	0,48	0,02
42	AML M7	47,XY,der(3)del(3)(p13),+8,der(11) t(3;11)(p?22;q25)	n.d.	n.d.	nein	initial	44	kurativ	166†	0,09	0,00
43	AML M2	46,XY	neg.	neg.	ja	initial	58	kurativ	456	0,18	0,00
44	AML M1	46,XX,t(21;22)(q22;q12)	neg.	neg.	nein	initial	67	kurativ	396	0,10	0,00
45	AML M4	46,XY[24] FISH: Trisomie 21 und zusätzliches Signal 5'CBFB; konstitutioneller. Karyotyp: 47,XY,+21[2]/46,XY[15](kleines Mosaik Trisomie21)	n.d.	n.d.	nein	initial	25	kurativ	398	0,20	0,00
46	kortikale T- ALL	46,XY	n.d.	n.d.	nein	initial	26	kurativ	1577	0,59	0,00
47	common ALL	nuc ish(mycx2), (p16,CEP9)x2(ABL,BCR)x2,(MLLx2), (IGHx2)(IGH3' sep IGHVx1)	n.d.	n.d.	nein	initial	37	kurativ	1182	0,74	0,06
48	common ALL	47,XX,+8,t(9;22)(q34;q11),der(9)t(9;22)(q34;q11) ish (ABL1x3),(BCRx4),(ABL1 con BCRx3)	n.d.	n.d.	nein	initial	40	kurativ	58	0,62	0,04
49	pro-B-ALL	46, XX, t(4;11)(q21;q23)	n.d.	n.d.	nein	initial	70	kurativ	353	1,55	0,00
50	common B- ALL	47,XY,del(6)(q?16q23),+19,add(20)(p)[11]	n.d.	n.d.	nein	initial	21	kurativ	1255	0,32	0,00
51	common B- ALL	n.d.	n.d.	n.d.	nein	initial	20	kurativ	5	0,73	0,03
52	unreife T- ALL	46,XY	n.d.	n.d.	nein	initial	43	kurativ	1064	0,43	0,00
53	common B- ALL	46,XY	n.d.	n.d.	nein	initial	73	kurativ	12†	0,40	0,03
54	pro-B-ALL	near tetraploid (nicht auswertbar)	n.d.	n.d.	nein	initial	63	kurativ	77†	0,37	0,05
55	common B- ALL	45,XY,inv(3)(p21;q26),der(7;8)(q10;q10, del(7)(q22),del(13)(q?14q31), -?14,?15[22],FISH:nuc ish (p16x1,p16dimx1,CEP9x2)/(D8Z2x2,MYCx2,IGHx2,IG Hdimx1)/(BCRx2;ABLx3)	n.d.	n.d.	nein	initial	63	kurativ	627	1,38	0,06
56	pro-T-ALL	n.d.	n.d.	n.d.	nein	rezidiert	68	kurativ	968	0,11	0,00

Nr.	Diagnose	Karyotyp	FLT3	NPM1	MDS	Krankheits- stadium	Alter bei Diagnose [Jahre]	Therapie- ansatz	Überlebenszeit [Tage]	miR-155	
										Expr.	p-Wert
57	reife ALL	46,XX,nuc ish(MLLtel,MLLcen)x2 (MlltelsepMLL-cenx1)[43/100] Molekularzytogenetisch Hinweis auf MLL (11q23)	n.d.	n.d.	nein	initial	83	palliativ	216	0,44	0,04
58	prä-B-ALL	48,XY,+der(5)t(5;?22),-22,+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)x2[2]/46,XY[18]	n.d.	n.d.	nein	initial	42	kurativ	435	0,15	0,00

n.d.: nicht bestimmt, †: Patient verstorben, Relative Expression im Vergleich zu HSZ, Signifikanzniveau bezogen auf HSZ

Tabelle 18: Expression der miR-155 nach Hemmung mittels ASO

SEM		15 h		24 h		48 h		72 h			15 h		24 h		48 h		72 h			15 h		24 h		48 h		72 h	
		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155
K	#1	22,5	23,1	22,1	23,1	22,8	23,4	22,7	23,6	LNA-AS	22,6	23,3	22,7	23,1	22,6	23,5	22,4	23,3	LNA-155	22,7	25,3	22,3	25,7	23,0	26,5	22,5	23,6
		22,4	23,2	22,1	22,9	22,5	23,4	22,7	23,6		22,6	23,5	22,4	23,1	22,5	23,3	22,5	23,2		22,4	25,1	22,4	25,2	22,8	25,9	22,7	23,6
		22,4	23,4	22,1	23,2	22,4	23,5	22,7	23,5		22,7	23,2	22,4	22,8	22,5	23,2	22,3	23,3		22,5	24,8	22,4	25,5	22,8	25,6	22,8	23,7
	#2	22,3	22,5	22,3	22,3	22,2	22,5	22,2	23,0		22,2	22,6	22,5	22,1	22,2	22,4	22,4	22,3		22,6	26,0	22,2	25,4	22,3	25,7	22,2	24,8
		22,1	22,3	22,2	22,2	22,1	22,3	22,3	22,7		22,2	22,4	22,4	22,4	22,1	22,5	22,3	22,4		22,4	25,8	22,2	25,3	22,2	25,5	22,1	24,9
		22,1	22,2	22,2	22,4	22,1	22,3	22,2	22,5		22,2	22,3	22,3	22,3	22,1	22,3	22,3	22,4		22,5	25,8	22,3	25,1	22,2	25,4	22,2	24,9
	#3	22,2	23,2	22,1	22,6	22,0	22,7	22,0	23,1		22,0	22,3	22,1	22,9	21,6	22,5	22,1	23,0		22,3	25,1	21,7	24,1	22,3	25,1	22,1	24,7
		22,3	23,0	22,0	22,8	21,5	22,4	22,0	22,8		21,9	22,3	22,0	22,6	21,5	22,6	22,2	22,9		22,0	24,7	21,6	24,0	22,2	24,8	22,2	24,7
		22,2	23,0	22,1	22,9	21,5	22,5	21,8	22,7		22,0	22,5	21,9	22,5	21,7	23,0	22,1	22,9		22,1	24,5	21,9	24,1	22,1	24,7	22,3	25,0
Rel. Expression		1		1		1		1			1,079		1,129		0,950		1,112			0,317		0,310		0,295		0,508	
p-Werte											0,25		0,27		0,61		0,20			0,00		0,00		0,00		0,00	
MV4-11		15 h		24 h		48 h		72 h			15 h		24 h		48 h		72 h			15 h		24 h		48 h		72 h	
		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155
K	#1	23,7	25,6	22,9	24,0	23,4	24,7	23,3	24,7	LNA-AS	23,7	25,3	23,3	25,2	23,0	24,5	22,7	24,1	LNA-155	23,7	25,0	23,7	25,5	22,8	25,2	22,7	25,1
		23,4	24,6	22,8	24,2	23,2	24,5	23,4	24,6		23,6	25,2	23,1	25,3	23,0	24,5	22,7	24,1		23,6	24,9	23,5	26,2	22,4	24,2	22,6	25,3
		23,3	24,7	23,1	25,1	23,3	24,4	23,2	24,7		23,6	24,7	23,1	24,5	23,4	25,1	22,6	24,1		23,5	24,7	23,5	25,5	22,4	24,3	23,1	26,0
	#2	23,4	24,8	22,7	23,5	23,1	24,3	23,1	24,5		23,1	24,0	23,3	23,9	23,1	23,7	23,0	24,2		23,1	24,7	23,1	25,0	22,8	25,3	22,8	24,9
		23,3	24,3	22,6	23,7	23,1	24,0	23,2	24,3		22,9	24,1	23,1	23,9	22,7	24,0	23,1	24,1		22,8	24,6	23,2	25,2	22,4	25,2	22,9	24,8
		23,2	24,2	22,8	24,2	22,9	24,1	23,0	24,3		23,0	23,9	23,2	23,7	22,8	24,4	23,0	24,1		22,8	24,7	23,1	25,2	22,4	24,7	22,9	25,6
	#3	23,2	23,7	22,7	22,9	23,1	23,3	23,7	23,8		22,9	23,1	23,1	22,8	23,1	23,1	23,2	23,2		22,5	23,2	22,7	24,0	23,4	25,2	23,2	24,0
		23,0	23,1	22,8	22,6	22,9	23,0	23,7	23,6		22,9	23,0	23,0	23,2	23,0	23,2	23,4	23,1		22,4	23,2	22,5	24,0	23,4	24,6	23,2	24,1
		22,8	23,1	22,9	23,3	23,0	22,9	23,5	23,6		22,9	22,8	23,0	23,0	23,2	23,4	23,3	23,1		22,4	23,1	22,7	24,1	23,4	24,7	23,3	24,5
Rel. Expression		1		1		1		1			1,048		1,095		0,941		1,020			0,831		0,636		0,532		0,556	
p-Werte											0,73		0,62		0,70		0,90			0,15		0,00		0,00		0,01	

Dargestellt sind die Ct-Werte aus drei Versuchen sowie die relative Expression bezogen auf die Kontrolle und die p-Werte.

Tabelle 19: Zellzahl nach Inhibition mit ASO

SEM		Zellzahl [x 10 <sup>6</sup> ]													
		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h
K	#1	0,8	0,9	1,0	2,2	LNA-AS	0,8	1,0	1,1	2,1	LNA-155	1,0	0,8	1,2	1,8
	#2	0,8	1,5	1,2	1,8		0,7	1,2	1,2	1,6		0,9	1,2	1,7	1,8
	#3	0,4	0,9	1,3	2,0		0,5	0,9	1,3	1,8		0,5	1,0	1,3	1,9
Mittelwert		0,66	1,10	1,20	1,99		0,66	1,03	1,20	1,80		0,80	0,99	1,40	1,84
p-Werte							0,99	0,78	0,98	0,37		0,46	0,66	0,33	0,38
MV4-11															
		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h
K	#1	1,6	1,7	2,0	2,9	LNA-AS	1,5	1,7	1,7	1,8	LNA-155	1,1	1,6	1,8	2,3
	#2	1,4	1,8	2,2	3,8		2,0	1,6	1,9	3,1		2,0	1,8	2,2	3,3
	#3	1,5	1,6	2,0	3,4		1,1	1,4	1,7	2,6		1,2	1,5	1,9	3,3
Mittelwert		1,51	1,72	2,08	3,39		1,52	1,56	1,76	2,47		1,43	1,63	1,94	2,98
n-Werte							0,96	0,22	0,02	0,12		0,82	0,55	0,35	0,40

Dargestellt sind die jeweilige Zellzahl aus drei Versuchen, der Mittelwert und der p-Wert bezogen auf die Kontrolle.

Tabelle 20: Metabolische Aktivität nach Inhibition mit ASO

SEM		A (650 – 450 nm)										
		24 h	48 h	72 h	LNA-AS	24 h	48 h	72 h	LNA-155	24 h	48 h	72 h
K	#1	0,17	0,31	0,49		0,13	0,25	0,39		0,08	0,22	0,39
	#2	0,07	0,15	0,19		0,03	0,08	0,13		0,03	0,10	0,13
	#3	0,03	0,11	0,27		0,01	0,08	0,23		0,01	0,08	0,17
Mittelwert		0,090	0,192	0,318		0,057	0,137	0,248		0,040	0,131	0,229
p-Werte						0,60	0,55	0,59		0,39	0,46	0,50
MV4-11												
		24 h	48 h	72 h	LNA-AS	24 h	48 h	72 h	LNA-155	24 h	48 h	72 h
K	#1	0,12	0,20	0,26		0,09	0,15	0,18		0,13	0,21	0,31
	#2	0,17	0,27	0,40		0,14	0,20	0,32		0,14	0,21	0,35
	#3	0,33	0,43	-		0,27	0,32	-		0,31	0,32	-
Mittelwert		0,210	0,298	0,331		0,167	0,221	0,248		0,194	0,258	0,292
p-Werte						0,64	0,40	0,49		0,86	0,65	0,69

Dargestellt sind die jeweilige Absorption aus drei Versuchen, die Mittelwerte und die p-Werte bezogen auf die Kontrolle.

**Tabelle 21: Apoptoserate nach Inhibition mit ASO**

SEM		Apoptoserate [%]													
		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h
K	#1	9,2	6,3	2,3	1,9	LNA-AS	7,6	8,8	2,8	3,4	LNA-155	7,3	10,8	4,4	4,9
	#2	7,1	7,6	6,0	4,7		9,7	7,5	6,8	5,7		9,9	7,8	7,4	8,0
	#3	5,4	5,5	4,1	4,6		5,5	5,0	8,0	3,0		6,0	6,0	4,7	4,9
Mittelwert		7,22	6,45	4,12	3,74		7,57	7,11	5,89	4,05		7,73	8,18	5,49	5,93
p-Werte							0,84	0,64	0,41	0,82		0,76	0,35	0,39	0,19
MV4-11															
		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h
K	#1	18,5	18,4	14,6	10,3	LNA-AS	24,6	26,0	22,2	15,4	LNA-155	23,0	19,7	15,0	13,4
	#2	17,8	18,6	12,5	9,9		18,3	22,6	15,5	10,9		18,2	22,9	13,7	14,7
	#3	11,8	11,8	11,0	9,5		14,8	17,3	16,2	14,6		13,5	11,5	11,5	9,9
Mittelwert		16,03	16,27	12,69	9,91		19,21	21,96	17,95	13,63		18,24	18,03	13,41	12,65
p-Werte							0,43	0,17	0,11	0,11		0,56	0,69	0,65	0,19

Dargestellt sind die Apoptoseraten in Prozent aus drei Versuchen, die Mittelwerte und die p-Werte bezogen auf die Kontrolle.

**Tabelle 22: Nekroserate nach Inhibition mit ASO**

SEM		Nekroserate [%]													
		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h
K	#1	14,5	21,2	12,7	16,0	LNA-AS	14,1	28,8	7,9	11,0	LNA-155	17,5	31,2	10,6	13,7
	#2	25,6	30,5	25,8	15,0		25,6	34,3	21,1	13,6		21,2	31,9	20,4	14,2
	#3	28,9	19,1	14,8	15,3		28,3	23,0	14,2	14,5		24,5	38,3	27,8	14,2
Mittelwert		23,01	23,62	17,78	15,44		22,65	29,04	14,41	13,01		21,05	33,79	19,58	14,01
p-Werte							0,96	0,31	0,58	0,14		0,71	0,08	0,79	0,02
MV4-11															
		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h
K	#1	20,0	21,6	25,9	13,4	LNA-AS	19,8	23,8	29,9	21,6	LNA-155	15,9	13,8	26,6	11,4
	#2	11,9	10,6	10,1	6,7		11,7	13,8	16,1	9,4		12,2	10,6	14,6	11,5
	#3	21,9	14,0	14,8	12,4		22,6	19,7	30,1	22,3		22,8	15,8	15,9	12,4
Mittelwert		17,91	15,40	16,95	10,81		18,05	19,10	25,37	17,75		16,93	13,41	19,05	11,75
p-Werte							0,98	0,44	0,27	0,24		0,83	0,62	0,75	0,70

Dargestellt sind die jeweiligen Nekroseraten aus drei Versuchen, die Mittelwerte aus drei Versuchen und die p-Werte bezogen auf die Kontrolle.



Tabelle 23: Expression der miR-155 nach Überexpression

RS4;11		15 h		24 h		48 h		72 h			15 h		24 h		48 h		72 h			15 h		24 h		48 h		72 h	
		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155
K	#1	22,9	26,0	22,5	24,6	22,5	24,9	21,9	24,0	AS	23,3	25,2	23,2	26,1	22,8	25,2	22,9	25,0	155	23,4	16,1	22,5	15,6	22,6	16,3	23,5	16,6
		22,8	25,2	22,5	24,8	22,5	24,9	22,0	24,2		23,4	25,3	23,1	25,2	22,9	25,4	23,0	25,1		23,3	16,0	22,2	15,6	22,4	15,8	23,3	16,5
		22,6	25,1	22,9	25,6	22,4	24,8	21,9	24,1		23,2	25,2	22,8	25,1	23,0	26,1	22,9	25,2		23,2	15,9	22,3	15,6	22,4	15,7	23,5	17,2
	#2	23,3	25,1	22,5	24,8	22,4	25,1	23,2	24,9		23,3	24,7	23,1	25,2	22,9	24,8	23,3	25,3		23,3	15,9	23,0	15,6	22,6	15,9	22,6	15,8
		23,0	24,6	22,5	24,7	22,2	25,0	22,7	25,1		23,3	24,9	22,7	24,6	22,8	25,0	23,3	25,3		23,1	15,8	22,8	15,5	22,3	15,4	22,5	15,9
		22,6	24,5	22,7	25,2	22,3	25,0	22,3	25,0		23,2	24,5	22,5	24,4	23,1	25,4	23,0	25,3		23,2	15,7	22,9	15,5	22,3	15,3	22,8	16,2
	#3	23,3	25,5	22,5	24,7	22,3	24,4	22,2	24,3		22,6	24,7	22,6	25,3	22,8	25,0	22,2	24,5		23,2	17,5	22,8	18,7	22,3	20,1	22,3	20,1
		23,1	25,1	22,6	25,0	22,1	24,2	22,2	24,3		22,8	24,7	22,3	24,6	22,7	25,0	22,4	24,5		23,1	17,1	22,5	18,3	22,1	19,3	22,2	20,1
		23,0	24,9	22,8	25,3	22,1	24,3	22,1	24,3		22,7	24,8	22,4	24,3	23,0	25,8	22,2	24,4		23,1	17,2	22,6	18,3	22,0	19,2	22,3	20,7
Rel. Expression		1		1		1		1			1,19		1,08		1,06		1,06			110,46		80,61		56,35		44,65	
p-Werte											0,08		0,26		0,42		0,37			0,00		0,00		0,00		0,00	
Jurkat		15 h		24 h		48 h		72 h			15 h		24 h		48 h		72 h			15 h		24 h		48 h		72 h	
		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155
K	#1	22,5	26,2	22,8	26,3	22,4	26,4	22,9	26,6	AS	23,0	26,0	23,1	26,6	21,7	25,4	22,8	26,6	155	23,0	16,3	22,9	16,2	22,4	16,6	23,2	16,7
		22,2	26,0	22,8	26,3	22,2	26,3	22,8	26,2		22,9	25,7	22,8	26,3	21,7	25,5	23,0	26,5		22,7	16,1	23,0	16,2	22,3	16,2	23,1	16,7
		22,2	25,8	22,8	25,8	22,2	26,4	22,6	26,3		22,9	25,9	22,7	26,2	21,8	26,1	22,8	26,4		22,6	16,1	22,9	16,1	22,2	16,2	23,2	16,9
	#2	22,1	25,2	21,5	24,5	22,5	25,7	22,7	26,3		22,2	24,3	22,6	25,1	22,9	26,3	23,0	26,6		22,1	15,2	22,4	15,4	23,1	15,9	22,8	16,4
		21,8	25,1	21,7	25,1	22,3	25,8	22,9	26,2		22,1	24,3	22,5	25,1	23,1	26,3	23,2	26,6		22,0	15,1	22,2	15,3	22,6	15,5	22,5	16,4
		21,8	25,0	21,5	25,2	22,4	25,6	22,8	26,3		22,2	24,1	22,4	25,0	23,2	27,0	23,0	26,6		21,9	15,1	22,3	15,3	22,8	15,5	22,6	16,8
	#3	23,1	27,2	22,4	26,2	22,5	26,4	22,6	26,5		23,1	26,3	22,7	26,9	22,6	36,7	22,7	26,5		22,9	15,9	22,9	16,0	23,1	17,1	23,2	17,7
		23,1	26,6	22,5	26,3	22,2	26,2	22,8	26,3		22,9	26,4	22,5	26,3	22,4	26,4	22,9	26,4		22,6	15,9	22,8	16,0	23,0	16,6	23,0	18,0
		22,8	26,3	22,7	26,7	22,3	25,9	22,6	26,4		23,0	26,2	22,3	26,0	22,6	26,6	22,7	26,5		22,5	15,8	22,7	16,1	22,8	16,5	23,1	18,4
Rel. Expression		1		1		1		1			1,50		1,14		0,99		1,02			209,28		223,96		208,97		139,00	
p-Werte											0,00		0,29		0,92		0,72			0,00		0,00		0,00		0,00	
HL60		15 h		24 h		48 h		72 h			15 h		24 h		48 h		72 h			15 h		24 h		48 h		72 h	
		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155
K	#1	21,6	25,1	21,6	24,8	21,7	24,5	21,7	24,2	AS	21,3	25,0	22,0	25,2	21,4	24,2	22,1	24,2	155	21,8	17,3	21,4	19,0	22,0	20,4	21,2	20,5
		21,4	24,9	21,5	25,1	21,5	24,5	22,2	24,2		21,1	24,6	22,0	24,7	21,4	23,9	22,0	24,4		21,8	17,4	21,6	18,9	21,8	20,1	21,1	20,4
		21,4	24,8	21,5	25,1	21,6	24,4	21,7	24,1		21,3	24,8	21,7	24,6	21,4	24,1	21,9	24,1		21,7	17,2	21,6	19,0	21,5	20,0	21,0	20,5
	#2	23,2	25,2	21,3	23,9	21,5	24,8	21,6	25,3		22,2	24,2	21,6	25,1	22,0	25,1	22,3	24,5		21,5	16,4	21,4	16,5	22,6	19,7	22,0	19,2
		22,4	25,3	20,9	23,7	21,6	24,8	21,7	25,1		22,0	24,1	21,6	25,0	21,9	25,0	22,5	24,8		21,2	16,1	21,1	16,3	22,3	19,1	22,1	19,4
		22,8	25,8	21,3	23,6	21,5	24,9	21,7	24,9		22,0	24,6	21,5	24,5	21,9	25,0	22,9	24,6		21,0	16,0	21,1	16,4	22,0	19,1	22,1	19,6
	#3	22,4	25,3	22,2	25,2	22,0	25,0	22,1	25,1		22,3	25,1	22,3	25,6	22,1	25,1	22,3	25,2		22,2	17,0	22,1	16,3	22,0	17,2	22,4	17,7
		22,2	25,2	22,1	25,0	22,2	25,1	22,4	25,2		22,1	25,1	22,0	25,0	22,1	24,5	22,5	24,9		21,9	17,0	21,7	16,2	21,7	16,8	22,1	17,3
		22,2	25,2	22,2	25,4	22,0	24,7	21,8	25,3		22,4	25,2	22,0	24,9	22,3	25,6	22,1	25,0		21,9	16,8	21,9	16,4	21,9	16,9	22,0	17,9
Rel. Expression		1		1		1		1			1,03		0,99		1,08		1,43			57,32		44,81		25,41		18,13	
p-Werte											0,85		0,92		0,27		0,01			0,00		0,00		0,00		0,00	

Dargestellt sind die Ct-Werte aus drei Versuchen, die relative Expression bezogen auf die Kontrolle und die p-Werte.

Tabelle 24: Zellzahl nach Überexpression

RS4;11		Zellzahl [x 10 <sup>6</sup> ]													
		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h
K	#1	0,4	0,7	1,0	1,4	AS	0,6	0,8	1,2	2,1	155	0,5	0,8	0,9	1,8
	#2	0,6	1,0	1,3	1,9		0,6	0,9	1,2	1,7		0,6	0,8	1,0	1,8
	#3	1,2	1,4	1,4	2,2		1,6	1,5	1,5	2,6		1,5	1,2	1,5	2,1
Mittelwert		0,70	1,02	1,22	1,81		0,93	1,10	1,32	2,16		0,89	0,92	1,13	1,90
p-Werte							0,62	0,79	0,59	0,39		0,67	0,71	0,73	0,77
Jurkat															
		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h
K	#1	0,5	1,1	1,7	4,3	AS	0,7	1,3	2,0	5,0	155	1,0	1,3	2,7	5,1
	#2	1,2	2,2	3,8	6,5		1,0	1,3	1,8	3,7		0,6	1,2	2,3	4,7
	#3	1,4	1,6	2,3	4,4		1,4	1,6	2,3	4,5		1,1	1,7	2,2	4,3
Mittelwert		1,03	1,63	2,64	5,06		1,04	1,42	2,06	4,42		0,91	1,38	2,39	4,69
p-Werte							0,97	0,60	0,45	0,48		0,74	0,53	0,73	0,66
HL60															
		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h
K	#1	1,8	1,7	2,8	4,9	AS	1,8	1,8	2,5	3,2	155	1,3	1,8	2,7	2,9
	#2	1,9	1,7	2,0	3,4		1,9	1,7	2,4	4,1		2,1	1,9	3,0	4,6
	#3	1,3	1,7	2,1	2,9		1,2	1,6	2,2	3,6		1,2	1,5	2,1	3,4
Mittelwert		1,69	1,69	2,28	3,74		1,61	1,70	2,37	3,63		1,54	1,74	2,58	3,65
p-Werte							0,80	0,96	0,77	0,87		0,67	0,77	0,46	0,91

Dargestellt sind die Zellzahl aus drei Versuchen, die Mittelwerte sowie die p-Werte bezogen auf die Kontrolle.

**Tabelle 25: Metabolische Aktivität nach Überexpression**

RS4;11		A (650 – 450 nm)										
		24 h	48 h	72 h		24 h	48 h	72 h		24 h	48 h	72 h
K	#1	-0,04	-0,01	0,02	AS	-0,02	0,03	0,07	155	-0,01	0,01	0,05
	#2	-0,02	-0,00	0,03		-0,03	-0,02	0,02		-0,02	-0,00	0,03
	#3	0,05	0,09	0,11		0,06	0,09	0,13		0,06	0,09	0,16
Mittelwert		-0,005	0,024	0,055		0,005	0,035	0,073		0,011	0,035	0,080
p-Werte						0,80	0,82	0,69		0,69	0,81	0,63
Jurkat												
		24 h	48 h	72 h		24 h	48 h	72 h		24 h	48 h	72 h
K	#1	0,27	0,39	0,41	AS	0,37	0,49	0,50	155	0,41	0,52	0,57
	#2	0,34	0,53	0,62		0,22	0,39	0,52		0,19	0,34	0,46
	#3	0,25	0,45	0,53		0,26	0,45	0,55		0,24	0,45	0,56
Mittelwert		0,289	0,458	0,519		0,283	0,441	0,525		0,279	0,436	0,532
p-Werte						0,91	0,76	0,93		0,90	0,76	0,87
HL60												
		24 h	48 h	72 h		24 h	48 h	72 h		24 h	48 h	72 h
K	#1	1,05	1,75	2,33	AS	0,80	1,36	2,16	155	0,69	1,35	2,10
	#2	0,79	1,18	1,83		0,92	1,36	2,12		1,04	1,57	2,43
	#3	1,36	2,14	2,40		1,76	2,37	-		1,67	-	-
Mittelwert		1,068	1,687	2,187		1,160	1,696	2,140		1,132	1,461	2,265
p-Werte						0,81	0,99	0,82		0,86	0,51	0,77

Dargestellt sind die Absorption aus drei Versuchen, die Mittelwerte und p-Werte bezogen auf die Kontrolle. Fehlende Werte waren nicht messbar.

Tabelle 26: Apoptoserate nach Überexpression

RS4;11		Apoptoserate [%]													
		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h
K	#1	16,1	21,7	14,1	10,6	AS	7,3	11,7	5,8	5,4	155	7,6	13,2	8,1	15,1
	#2	16,6	17,1	10,0	10,7		14,4	15,8	10,2	17,0		11,9	18,9	9,6	19,0
	#3	27,0	22,9	11,6	11,9		21,6	14,3	7,0	10,3		17,6	10,3	14,2	11,8
Mittelwert		19,87	20,56	11,87	11,10		14,45	13,93	7,67	10,92		12,35	14,13	10,65	15,31
p-Werte							0,38	0,04	0,08	0,96		0,18	0,12	0,61	0,18
Jurkat															
		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h
K	#1	5,0	5,3	5,8	5,3	AS	4,4	4,6	6,7	4,4	155	5,9	4,7	9,8	5,0
	#2	5,9	8,0	6,7	8,1		6,6	9,0	7,7	8,0		7,0	9,2	6,1	15,0
	#3	7,6	6,3	4,6	11,5		7,5	9,2	6,5	9,5		7,7	6,3	6,0	8,0
Mittelwert		6,17	6,55	5,69	8,29		6,17	7,58	6,97	7,30		6,85	6,72	7,31	9,33
p-Werte							1,00	0,58	0,16	0,69		0,51	0,92	0,33	0,78
HL60															
		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h
K	#1	12,2	10,5	7,9	6,4	AS	12,7	11,8	10,4	8,7	155	14,5	12,0	11,6	10,3
	#2	11,2	8,6	8,7	7,2		6,7	8,9	8,6	6,3		6,2	8,3	7,0	4,7
	#3	12,5	12,5	11,6	9,7		12,6	12,7	12,8	10,7		11,5	12,3	9,3	12,1
Mittelwert		11,96	10,50	9,39	7,78		10,63	11,15	10,57	8,59		10,72	10,89	9,29	9,03
p-Wert							0,92	0,71	0,51	0,65		0,66	0,83	0,96	0,65

Dargestellt sind die Apoptoseraten aus drei Versuchen in Prozent, die Mittelwerte und die p-Werte bezogen auf die Kontrolle.

Tabelle 27: Nekroserate nach Überexpression

RS4;11		Apoptoserate [%]													
		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h
K	#1	24,8	27,1	21,8	20,2	AS	11,8	15,1	10,1	10,9	155	12,2	19,1	16,1	20,8
	#2	25,5	30,4	36,1	29,8		37,8	38,8	33,9	28,2		27,0	26,4	33,0	30,8
	#3	15,3	15,5	11,1	15,4		13,0	12,0	7,7	19,1		10,9	13,5	21,7	18,4
Mittelwert		21,85	24,31	23,01	21,78		20,85	21,95	17,24	19,41		16,71	19,67	23,61	23,34
p-Werte							0,92	0,82	0,63	0,74		0,46	0,47	0,95	0,80
Jurkat															
		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h
K	#1	13,9	15,3	8,8	5,8	AS	8,2	9,9	10,3	4,4	155	7,7	8,3	10,9	3,6
	#2	9,8	6,5	4,7	3,7		10,0	15,9	8,7	5,3		12,5	15,5	12,5	9,1
	#3	24,0	25,1	15,9	16,4		17,8	24,6	23,1	19,3		15,5	26,2	26,8	18,3
Mittelwert		15,87	15,62	9,77	8,64		11,97	16,83	14,03	9,68		11,87	16,63	16,72	10,35
p-Werte							0,50	0,87	0,49	0,88		0,46	0,90	0,32	0,78
HL60															
		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h		15 h	24 h	48 h	72 h
K	#1	9,4	10,5	15,5	8,7	AS	9,3	10,6	26,2	19,9	155	11,1	8,6	28,4	30,0
	#2	8,8	8,8	13,3	10,6		8,2	7,1	15,7	10,7		6,7	5,3	11,7	9,5
	#3	19,1	14,7	15,2	9,3		13,7	12,8	15,0	10,3		16,1	12,9	16,0	11,2
Mittelwert		12,41	11,36	14,66	9,53		10,40	10,15	18,97	13,65		11,30	8,92	18,69	16,90
p-Wert							0,63	0,64	0,36	0,32		0,81	0,44	0,51	0,38

Dargestellt sind die Nekroseraten aus drei Versuchen in Prozent, die Mittelwerte und die p-Werte bezogen auf die Kontrolle.

Tabelle 28: Zellzahl unter Sorafenib

SEM		Zellzahl [x 10 <sup>6</sup> ]																
		6 h	24 h	48 h	72 h	96 h		6 h	24 h	48 h	72 h	96 h		6 h	24 h	48 h	72 h	96 h
DMSO	#1	0,7	1,0	1,2	1,5	1,9	0,73µM	0,7	0,7	0,8	1,0	0,8	7,3 µM	0,7	0,7	0,4	0,3	0,5
	#2	0,5	1,0	1,1	1,8	1,5		0,6	1,1	1,0	1,1	1,0		0,5	0,5	0,5	0,4	0,5
	#3	0,8	1,1	1,8	2,4	3,5		0,7	1,2	1,5	1,7	1,4		0,8	0,8	0,6	0,4	0,3
Mittelwert		0,64	1,05	1,37	1,91	2,32		0,68	1,01	1,12	1,26	1,04		0,71	0,65	0,53	0,36	0,42
p-Werte								0,69	0,86	0,46	0,14	0,17		0,56	0,02	0,04	0,02	0,09
MV4-11																		
		6 h	24 h	48 h	72 h	96 h		6 h	24 h	48 h	72 h	96 h		6 h	24 h	48 h	72 h	96 h
DMSO	#1	1,1	1,0	1,1	1,3	1,5	0,73 µM	1,1	1,1	1,1	0,9	0,7	7,3 µM	1,0	1,0	0,7	0,5	0,5
	#2	0,9	1,3	1,1	1,6	1,7		1,2	1,0	1,2	1,1	0,7		1,1	1,0	0,8	0,3	0,4
	#3	0,9	0,9	1,4	1,6	1,6		1,1	0,9	1,0	0,9	0,7		0,9	0,8	0,7	0,6	0,3
Mittelwert		0,98	1,05	1,18	1,47	1,62		1,13	1,01	1,11	0,96	0,70		0,99	0,94	0,70	0,47	0,38
p-Werte								0,09	0,78	0,53	0,02	0,00		0,90	0,44	0,02	0,00	0,00

Dargestellt sind die Zellzahl aus drei Versuchen, die Mittelwerte und die p-Werte bezogen auf die Kontrolle (DMSO).

Tabelle 29: Metabolische Aktivität unter Sorafenib

SEM		A (650 – 450 nm)													
		24 h	48 h	72 h	96 h		24 h	48 h	72 h	96 h		24 h	48 h	72 h	96 h
DMSO	#1	0,35	0,59	0,69	0,90	0,73µM	0,16	0,24	0,19	0,31	7,3 µM	0,15	0,12	0,05	0,05
	#2	0,36	0,54	0,66	0,74		0,20	0,19	0,19	0,22		0,12	0,06	0,01	-0,00
	#3	0,54	0,64	0,81	0,85		0,34	0,34	0,34	0,33		0,22	0,14	0,06	0,04
Mittelwert		0,417	0,591	0,719	0,831		0,233	0,257	0,241	0,287		0,163	0,103	0,038	0,030
p-Werte							0,09	0,01	0,00	0,00		0,04	0,00	0,00	0,00
MV4-11															
		24 h	48 h	72 h	96 h		24 h	48 h	72 h	96 h		24 h	48 h	72 h	96 h
DMSO	#1	0,25	0,28	0,39	0,56	0,73 µM	0,23	0,15	0,13	0,13	7,3 µM	0,12	0,05	0,08	0,13
	#2	0,26	0,33	0,39	0,45		0,18	0,16	0,13	0,09		0,08	0,05	0,06	0,07
	#3	0,43	0,38	0,35	0,61		0,26	0,13	0,10	0,10		0,19	0,09	0,05	0,08
Mittelwert		0,313	0,334	0,376	0,539		0,221	0,146	0,119	0,110		0,132	0,064	0,063	0,094
p-Werte							0,26	0,01	0,00	0,01		0,07	0,00	0,00	0,01

Dargestellt sind die Absorption aus drei Versuchen, die Mittelwerte und die p-Werte bezogen auf die Kontrolle (DMSO).

Tabelle 30: Apoptoserate unter Sorafenib

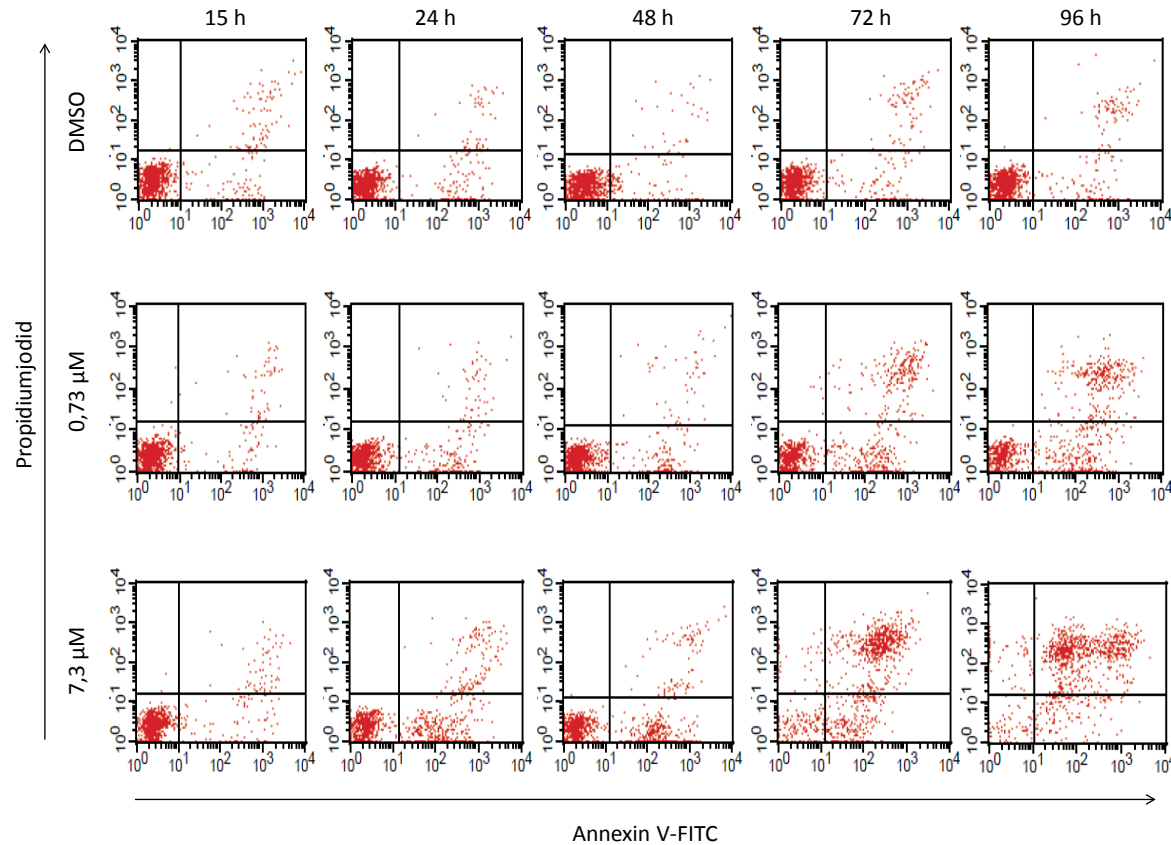
SEM		Apoptoserate [%]																
		6 h	24 h	48 h	72 h	96 h		6 h	24 h	48 h	72 h	96 h		6 h	24 h	48 h	72 h	96 h
DMSO	#1	3,0	2,1	3,1	2,6	3,1	0,73 µM	5,8	1,9	1,8	1,2	1,7	7,3 µM	9,8	19,6	14,0	15,1	9,9
	#2	3,8	1,2	2,3	2,3	2,3		7,9	1,4	0,9	1,6	1,5		15,7	23,3	14,7	14,3	9,6
	#3	2,4	2,9	4,4	2,7	2,8		4,0	2,0	0,7	1,2	1,7		9,1	6,7	10,9	10,7	9,2
Mittelwert		3,09	2,05	3,27	2,55	2,71		5,88	1,77	1,12	1,35	1,63		11,54	16,55	13,20	13,37	9,57
p-Werte								0,12	0,64	0,05	0,00	0,03		0,05	0,10	0,01	0,01	0,00
MV4-11																		
DMSO	#1	12,0	12,8	18,2	14,0	9,5	0,73 µM	13,9	24,7	33,7	35,7	33,3	7,3 µM	13,7	38,3	45,8	17,2	12,3
	#2	7,8	9,9	8,7	8,8	8,6		7,7	16,6	13,9	24,6	26,1		7,9	32,5	35,0	23,0	15,0
	#3	3,7	6,6	8,0	11,3	10,4		10,2	28,6	30,3	25,2	17,5		7,9	19,8	19,7	21,8	9,9
Mittelwert		7,85	9,75	11,63	11,37	9,51		10,61	23,32	25,97	28,51	25,66		9,86	30,19	33,51	20,68	12,37
p-Werte								0,41	0,04	0,13	0,03	0,07		0,55	0,05	0,09	0,02	0,18

Dargestellt sind die Apoptoseraten in Prozent, die Mittelwerte aus drei Versuchen und die p-Werte bezogen auf die Kontrolle (DMSO).

Tabelle 31: Nekroserate unter Sorafenib

SEM		Nekroserate [%]																
		6 h	24 h	48 h	72 h	96 h		6 h	24 h	48 h	72 h	96 h		6 h	24 h	48 h	72 h	96 h
DMSO	#1	4,8	8,3	6,4	2,3	3,5	0,73 µM	3,9	7,1	7,4	2,8	2,5	7,3 µM	4,2	10,4	26,2	36,2	22,5
	#2	2,2	2,2	2,3	3,0	3,4		2,0	2,1	2,4	2,2	3,3		1,8	3,8	6,9	21,3	61,9
	#3	2,9	2,2	3,8	3,4	3,2		1,7	2,3	0,8	2,6	2,2		2,2	3,0	2,0	24,7	49,2
Mittelwert		3,31	4,24	4,17	2,89	3,39		2,54	3,83	3,57	2,54	2,65		2,75	5,71	11,71	27,39	44,53
p-Werte								0,50	0,88	0,81	0,43	0,15		0,62	0,66	0,42	0,03	0,07
MV4-11																		
DMSO	#1	19,0	11,4	11,5	10,3	7,7	0,73 µM	18,4	12,4	16,7	24,6	33,1	7,3 µM	16,4	17,3	28,4	75,8	83,7
	#2	8,4	5,4	3,8	8,2	7,0		4,9	5,5	6,3	21,7	29,0		5,6	10,2	9,7	58,5	71,7
	#3	9,1	6,3	8,2	10,3	10,5		6,7	9,1	20,7	31,7	40,5		7,7	10,0	22,1	37,7	39,9
Mittelwert		12,16	7,69	7,78	9,60	8,39		9,99	9,01	14,60	26,00	34,19		9,88	12,51	20,08	57,33	65,13
p-Werte								0,71	0,65	0,26	0,03	0,01		0,66	0,19	0,14	0,05	0,05

Dargestellt sind die Nekroserate in Prozent aus drei Versuchen, die Mittelwerte und die p-Werte bezogen auf die Kontrolle (DMSO).



**Abbildung 30: Durchflusszytometrische Messung der Apoptose und Nekrose**

Dargestellt ist ein exemplarischer Versuch. Rote Punkte stehen für einzelne Ereignisse im Verlauf des Versuches unter unterschiedlichen Kulturbedingungen. DMSO: Kontrollansatz, 0,73  $\mu\text{M}$ : 0,73  $\mu\text{M}$  Sorafenib, 7,3  $\mu\text{M}$ : 7,3  $\mu\text{M}$  Sorafenib.  $n = 1$



Tabelle 32: Expression unter Sorafenib

SEM		6 h		24 h		48 h		72 h		96 h			15 h		24 h		48 h		72 h		96 h			15 h		24 h		48 h		72 h		96 h	
		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155
DMSO	#1	22,2	22,7	22,4	23,6	22,2	23,3	22,2	23,9	22,3	24,2	0,73 µM	22,1	22,9	22,5	23,1	21,8	22,9	21,8	23,0	21,5	23,7	7,3 µM	22,2	23,0	22,1	23,0	22,1	22,9	22,4	23,5	22,5	23,2
		22,3	23,3	22,4	23,3	22,0	23,3	22,3	23,7	22,2	23,9		22,0	22,8	22,2	23,1	21,9	22,8	21,9	23,1	21,9	23,3		22,1	23,5	22,0	22,7	22,1	22,8	22,3	23,2	22,3	23,2
		22,2	23,0	22,4	23,2	22,1	23,5	22,1	23,5	22,0	23,9		22,0	22,9	22,1	23,3	22,0	22,8	21,6	23,1	22,0	23,0		22,0	23,4	21,9	22,6	22,0	22,7	22,5	23,2	22,3	23,4
	22,5	22,7	22,4	23,3	22,3	23,0	22,1	23,2	22,2	23,3	22,4		23,5	22,5	23,1	22,6	23,0	21,6	22,4	21,7	23,3	22,3		23,0	22,8	24,1	22,3	22,6	23,3	24,4	24,0	23,6	
	22,4	22,9	22,4	23,1	22,0	23,0	22,3	23,1	22,4	23,2	22,3		23,4	22,3	23,2	22,5	23,2	21,9	22,4	21,9	23,2	22,1		23,4	22,5	23,9	22,3	22,5	23,5	24,1	23,7	23,6	
	22,5	22,6	22,3	22,9	22,1	23,4	22,0	23,0	22,1	23,1	22,3		23,6	22,4	23,2	22,4	23,2	21,6	22,7	22,2	23,3	22,1		23,5	22,8	23,9	22,1	22,5	23,6	23,8	23,8	23,6	
	22,4	22,8	21,9	23,2	22,0	22,3	22,3	23,3	22,0	23,1	22,2		22,5	22,2	22,5	22,1	22,5	22,3	23,8	21,8	23,1	22,2		22,6	22,4	23,4	21,8	22,4	22,1	22,7	23,0	23,2	
	22,1	23,5	21,8	23,0	21,7	22,7	22,4	23,1	22,0	22,9	22,0		23,0	22,1	22,6	22,0	22,3	22,7	23,9	21,7	23,0	22,1		22,8	22,1	23,2	21,7	22,2	22,2	22,1	22,8	23,1	
	22,2	23,4	22,0	22,9	21,6	22,7	22,2	22,9	21,9	23,0	22,2		22,9	22,1	22,4	22,1	22,5	22,4	24,3	22,1	22,9	22,0		23,0	22,3	23,3	21,6	22,4	22,3	22,2	23,0	23,2	
	Rel. Expression		1		1		1		1		1		0,89		1,16		1,21		0,93		0,95			0,83		0,98		1,28		1,37		1,79	
p-Werte												0,23		0,05		0,03		0,42		0,67		0,09		0,70		0,00		0,00		0,00			
MV4-11		6 h		24 h		48 h		72 h		96 h			6 h		24 h		48 h		72 h		96 h <td rowspan="2"></td> <th colspan="2">15 h</th> <th colspan="2">24 h</th> <th colspan="2">48 h</th> <th colspan="2">72 h</th> <th colspan="2">96 h</th>			15 h		24 h		48 h		72 h		96 h	
		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155		RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155	RNU	155
DMSO	#1	22,6	22,9	22,2	23,0	22,3	22,6	21,9	22,6	22,5	23,1	0,73 µM	22,3	23,1	22,3	22,7	22,2	22,1	22,0	22,4	22,3	22,8	7,3 µM	22,3	22,9	22,3	23,3	22,0	22,7	22,0	22,7	22,7	23,1
		22,6	22,9	22,3	22,7	21,9	22,5	22,0	22,3	22,4	22,8		22,1	22,9	22,2	22,6	22,2	22,7	22,3	22,5	22,5	22,7		22,2	23,2	22,3	23,1	22,0	22,6	21,9	22,4	22,6	22,4
		22,5	23,2	22,3	22,6	22,0	23,0	21,8	22,3	22,2	22,7		22,3	23,1	22,1	22,7	22,2	22,4	21,9	22,8	22,6	22,7		22,2	23,6	22,3	23,0	21,9	22,5	22,0	22,2	22,7	22,6
	23,0	23,3	22,9	23,3	23,0	23,2	22,7	23,6	22,6	23,3	22,9		23,5	22,6	23,1	22,2	23,0	22,0	23,1	22,0	22,8	22,2		22,3	22,3	22,1	22,4	22,8	-	-	-	-	
	22,8	23,6	22,8	23,1	22,5	23,2	22,7	23,3	22,6	23,2	22,8		23,2	22,5	23,1	21,9	23,1	22,0	22,8	21,9	22,9	22,0		22,3	22,2	22,6	22,2	22,8	-	-	-	-	
	22,7	24,1	22,8	23,1	22,5	23,1	22,6	23,2	22,9	23,2	22,8		23,2	22,5	23,2	22,0	22,8	21,9	22,7	21,6	23,1	21,9		22,3	22,2	22,7	22,4	23,1	-	-	-	-	
	23,5	24,9	23,0	25,2	22,9	24,0	23,0	24,2	22,9	24,6	22,9		24,5	23,2	24,5	22,8	25,3	22,9	24,7	22,5	24,6	23,1		25,1	23,0	24,0	23,2	24,0	22,7	25,1	23,6	25,1	
	23,1	24,7	23,0	24,5	22,6	24,0	23,1	23,8	22,7	24,4	22,7		24,4	23,1	24,4	22,6	24,2	23,0	24,6	22,6	24,5	22,8		25,4	23,0	24,2	22,8	23,7	22,7	24,2	23,5	25,2	
	23,2	25,0	23,2	24,2	22,6	24,6	22,9	24,0	22,4	24,4	22,9		25,1	22,8	24,4	22,8	24,0	22,9	25,5	22,8	24,3	23,0		26,8	23,1	24,3	22,8	23,9	22,8	24,4	23,5	25,5	
	Rel. Expression		1		1		1		1		1		0,93		0,98		0,93		0,80		0,91			0,77		1,00		1,06		0,80		1,21	
p-Werte												0,63		0,86		0,67		0,09		0,59		0,29		0,99		0,59		0,26		0,45			

Dargestellt sind die Ct-Werte aus drei Versuchen, die relative Expression und die p-Werte bezogen auf die Kontrolle (DMSO).

**Abkürzungsverzeichnis**

5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
A	Adenosin
ADAR	RNA-spezifische Adenosin-Desaminase
AGO	Argonautprotein
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ALV	<i>Avian leucosis virus</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
AP	<i>Activator protein</i>
APL	Akute Promyelozytenleukämie
ASO	<i>Antisense Oligonucleotide</i>
BAALC	<i>Brain and acute leukemia, cytoplasmic</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BIC	<i>B-cell integration cluster</i>
BL	Burkitt-Lymphom
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytidin
CCR4	<i>C-C chemokine receptor type 4</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CR	Komplette Remission
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EBNA2	<i>Epstein-Barr nuclear antigen 2</i>

EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF4E	Eukaryotischer Initiationsfaktor 4E
eIF4F	Eukaryotischer Initiationsfaktor 4F
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
ETS	<i>E26 transformation specific</i>
Exp5	Exportin 5
FAB	<i>French, American, British</i>
FACS	<i>Fluorescens activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FLT3	<i>Fms-like tyrosin kinase 3</i>
FOXO3	Forkhead-Box-Protein 3
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
FSC	<i>Forward scatter</i>
FXBW7	<i>F-box and WD repeat domain-containing 7</i>
G	Guanosin
GAPDH	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
GVHD	<i>Graft versus host disease</i>
HG	<i>Host gene</i>
hgNHL	hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom
HHV	Humanes Herpesvirus
HL	Hodgkin-Lymphom
HOX	Homeobox Gen
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
ITD	<i>Internal tandem duplication</i> , Interne Tandemduplikation
JAK	Januskinase
KM	Knochenmark
LMP1	<i>Latent membrane protein 1</i>
LNA	<i>Locked nucleic acid</i>

LSM	<i>Laser scanning microscope</i>
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
miR/miRNA	<i>MicroRNA</i>
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
MRB	<i>MACS running buffer</i>
MRD	<i>Minimal residual disease</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
N	Nukleotid
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NOT	<i>Negative on TATA</i>
NPM1	Nukleophosmin 1
P	Phosphat
PACT	<i>Protein activator of PKR</i>
pB	Peripheres Blut
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKR	Proteinkinase R
PML	Promyelozyten-Leukämie-Gen
Pol II	Polymerase II
P/S	Penicillin / Streptomycin
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
qPCR	<i>Quantitative Real-Time polymerase chain reaction</i>
RAR $\alpha$	Retinsäurerezeptor $\alpha$
REST	<i>Relative expression software tool</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RLC	<i>RISC loading complex</i>

RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RPMI	<i>Roswell park memorial institute</i>
RT	Reverse Transkription
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i>
SHIP1	<i>Src homology 2 domain containing inositol phosphatase 1</i>
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
SMAD	<i>Small body size mothers against decapentaplegic</i>
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismen
SOCS1	<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
T	Thymin
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TKD	Tyrosinkinase-Domäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	Tetradecanoyl-phorbolacetat
TRBP	<i>TAR RNA binding protein</i>
U	Uridin
UTR	Nicht-translatierte Region
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WST	<i>Water soluble tetrazolium</i>

## **Thesen der Dissertation**

- 1) Akute Leukämien sind seltene Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzellen, die häufig trotz intensiver Therapie tödlich verlaufen. Die leukämischen Zellen zeigen ein autonomes Wachstum und reifen nicht zu funktionstüchtigen Blutzellen aus.
- 2) microRNAs sind kurze, einzelsträngige RNA-Moleküle, welche durch verschiedene Mechanismen die Proteinbiosynthese regulieren. Meist führen sie zu einer verminderten Expression der Zielgene.
- 3) Maligne entartete Zellen zeigen häufig genetische Aberrationen, die zu einer veränderten Expression von Genen führen. Dies kann in malignen Zellen zu einer Dysregulation der Expression von microRNAs führen.
- 4) Die miR-155 ist in verschiedenen hämatologischen Neoplasien dereguliert. Dies gilt im Besonderen für Hodgkin-Lymphome, Non-Hodgkin-Lymphome und akute Leukämien mit Mutationen im FLT3-Gen.
- 5) Deutliche Unterschiede in der miR-155-Expression zwischen den unterschiedlichen Zelllinien konnten festgestellt werden. Auch die *de novo*-Leukämiezellen zeigten eine differenzielle Expression.
- 6) Eine hohe miR-155-Expression zeigte eine Assoziation mit bestimmten molekularbiologischen Auffälligkeiten (FLT3-Mutation, NPM1-Mutation) bzw. mit definierten Subtypen der akuten Leukämie.
- 7) Eine prognostische Bedeutung konnte der miR-155 in dem untersuchten Patientenkollektiv nicht beigemessen werden.
- 8) Nach Überexpression und Suppression der miR-155 konnte kein direkter Effekt auf das Zellwachstum der untersuchten Zelllinien festgestellt werden. Möglicherweise kann die Suppression der miR-155 einen additiven Effekt zu klassischen Chemotherapeutika haben, was in weiteren Untersuchungen evaluiert werden sollte.
- 9) Der Multikinaseinhibitor Sorafenib, der neben der FLT3 noch weitere Tyrosinkinasen hemmt, zeigt antileukämische Effekte sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.
- 10) Ein starker antileukämischer Effekt durch den Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib konnte *in vitro* an Zelllinien bestätigt werden. Eine erwartete Hemmung der miR-155-Expression durch Hemmung der FLT3 wurde jedoch nicht beobachtet.
- 11) Das Protein SHIP1 ist ein negativer Regulator des PI3K/Akt-Signalweges, welcher eine Schlüsselfunktion in Proliferations- und Differenzierungsprozessen einnimmt. SHIP1 wurde als Zielgen der miR-155 erkannt.

12) Eine erhöhte Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges aufgrund einer Herunterregulierung von SHIP1 konnte nach Überexpression der miR-155 in einer Zelllinie gezeigt werden.

## **Danksagung**

Danken möchte ich zunächst Herrn Prof. Dr. Christian Junghanß für die Möglichkeit, eine experimentelle Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Sein ehrlicher Optimismus motivierte mich. Auch war er mir außerhalb des Labores ein gutmütiger Mentor. Ich erinnere mich gerne an die verregneten Laborfreizeiten und den harten Gepäckträger zurück.

Ein großer Dank gilt natürlich auch der gesamten Arbeitsgruppe, besonders Dr. Meike Dahlhaus und Dr. Catrin Roolf, die viel Zeit und Geduld investiert haben, um mich in die zellbiologischen und molekularbiologischen Methoden einzuarbeiten. Aber auch Anett Sekora, die mir die Durchflusszytometrie näherbrachte, und Gudrun Knübel für ihre Hilfe beim „Blotten“ und ihr mütterlich offenes Ohr. Herrn PD Dr. rer. nat. Hugo Murua Escobar möchte ich für die Durchsicht der Dissertation danken.

Dem Land Mecklenburg-Vorpommern möchte ich danken für die Großzügigkeit, mir ein Stipendium zu gewähren, welches es mir ermöglicht hat, ein Urlaubssemester zu nehmen und mich in dieser Zeit auf die Laborarbeit zu konzentrieren.

Die konfokale Laser-Rastermikroskopie habe ich Herrn Dr. Frank Lüthen aus dem Arbeitsbereich Zellbiologie von Herrn Prof. Dr. J. Rychly zu verdanken.

Meinen Eltern möchte ich danken, dafür dass sie meinen bisherigen Lebensweg mit großem Interesse und viel Einfühlungsvermögen begleiteten. Ohne ihre Hartnäckigkeit wäre es vielleicht nicht so weit gekommen.

Besonderer Dank gilt aber natürlich auch derjenigen, die den Prozess der Entstehung dieser Dissertation aus nächster Nähe miterlebte und wohl den größten Verzicht üben musste: meiner Freundin Malathi Anhuth. Sie hat die Aufgabe bewältigt, mich in dieser Zeit auszuhalten und nicht den Mut zu verlieren.